

# Desenvolvimento de metodologia para obtenção de haplóides de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) via cultura de anteras<sup>1</sup>

Methodology development to obtain cashew tree haploids (*Anacardium occidentale* L.) through rising of anthers

Jamili Silva Fialho<sup>2</sup>, Dalva Maria Bueno<sup>3</sup>, Antônio Teixeira Cavalcante Júnior<sup>3</sup> e  
Cristina Paiva da Silveira Carvalho<sup>4</sup>

## RESUMO

Foram pesquisados ambientes e meios de cultura visando a desenvolver metodologias para obtenção de haplóides de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) via cultura de anteras. Os botões florais foram coletados de plantas matrizes do clone anão precoce CCP 76. Realizaram-se avaliações quanto às frequências de oxidação e de contaminação e ao grau de desenvolvimento. Quanto ao índice de desenvolvimento, verificou-se que as anteras se comportaram melhor quando mantidas inicialmente no escuro e transferidas para o mesmo meio com concentrações ou proporções diferentes, ou para outro meio que favorecesse seu crescimento após indução inicial. Em geral, o carvão ativado, acrescido ao meio nutritivo, inibiu a oxidação em detrimento das anteras conduzidas no claro, trocadas de lugar a cada quatro dias, na mesma placa de Petri, as quais apresentaram a maior frequência de oxidação. O melhor grau de desenvolvimento foi alcançado nos meios MS e MS/4 e quando o Thidiazuron foi acrescido na concentração 0,005 µM. Os resultados gerais mostraram que, para as anteras estudadas, ocorreram desenvolvimento e formação de calos sem, contudo, terem apresentado células embriogênicas, sugerindo outros estudos de fatores como mudança de meio de cultura após choque inicial no escuro.

**Termos para indexação:** meios de cultura, clone anão precoce CCP 76, propagação.

## ABSTRACT

Culture media and environments were investigated aiming to develop methodologies to obtain haploids of cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) through anthers culture. Floral buttons explants were taken from early dwarf clones CCP 76. Incidence of oxidation and contamination, as well as degree of development, was observed. As to the index of development, it was observed that anthers presented better development when kept initially at dark and then transferred to the previous medium, but with different concentrations or proportions, or when transferred to a medium known to favor anthers growth after initial induction. Overall, activated coil added to the nutrient medium inhibited oxidation in detriment of anthers managed under light, whose places were switched every four days within the same Petri dish, which presented higher incidence of oxidation. The best degree of development was reached in MS and MS/4 media and, also, when Thidiazuron was added in the concentration of 0.005 µM. The results showed that the studied anthers developed callus, without, however, the presence of embryogenic cells, suggesting the need of further studies, such as switching medium after initial dark shock.

**Index terms:** culture medium, early dwarf clone CCP 76, propagation.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em: 06/06/2004.

Aprovado em: 08/03/2005.

Trabalho da primeira autora para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela UECE, CE

<sup>2</sup> Bióloga, Estudante de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, CCA/UFC, CE

<sup>3</sup> Eng. Agrônomos, D.Sc., Pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, CE

<sup>4</sup> Bióloga, M.Sc., Profa. do Curso de Ciências Biológicas, CCS/UECE, CE

## Introdução

A família Anacardiaceae possui cerca de 600 espécies, sendo o gênero *Anacardium* representado por 20 espécies que têm como centro de dispersão a América Tropical. O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., é originário do Brasil, com área de distribuição no Nordeste. Hoje o cajueiro está distribuído na larga faixa do globo terrestre que vai desde a Flórida até a África do Sul (Almeida et al., 2002).

A agroindústria do caju é muito importante para a economia da região Nordeste, pela geração de emprego, renda e impostos (Barros et al., 1993). Nas indústrias que trabalham com a castanha no Estado do Ceará, estão empregados cerca de 20.000 trabalhadores. Na zona rural, o cajueiro emprega aproximadamente 300.000 pessoas, especialmente na época da colheita que coincide com a entressafra das culturas anuais. Portanto, o cajueiro no campo tem dupla função: empregar na época de pouco trabalho e evitar o êxodo rural para as capitais e as grandes cidades do interior. Os principais produtos do caju são a castanha e o pedicelo (tradicionalmente conhecido como pedúnculo) ou pseudofruto. A castanha do caju é o principal produto de exportação do Ceará e, também, a mais importante fonte de entrada de divisas para o Estado (Almeida et al., 2002). A crescente expansão da indústria de aproveitamento do pseudofruto, a partir do qual são obtidos cerca de 30 subprodutos, juntamente com a participação no mercado de frutas de mesa, foi outro fator motivador da disseminação do cajueiro para outras regiões do país, como alternativa econômica real, em cultivos com adoção de elevados níveis de tecnologia, notadamente, clones melhorados.

Existe um déficit na produção de castanha de caju, com boas perspectivas para o aumento do consumo nos mercados americano, europeu e japonês onde, atualmente, é de 100 a 200 gramas por pessoa /ano, apesar de ser uma noz nutritiva e de baixo custo no mercado mundial (Almeida et al., 2002). A baixa produtividade deve-se a diversos fatores, principalmente à formação dos pomares através de sementes, por ser o cajueiro uma planta alógama (Barros, 1988). O pequeno número de clones comerciais disponíveis, juntamente com a estreita base genética do material inicial (Almeida et al., 1993; Barros et al., 1993) caracterizam um estado de vulnerabilidade genética e priorizam ações para o enriquecimento da base genética e obtenção de novos clones. Entre os fatores responsáveis pelo

decréscimo na produtividade do cajueiro, a não utilização de clones melhorados é o mais importante. As seleções de cajueiro anão-precoce com produtividade de 1300 kg de castanhas/ha em regime de sequeiro e aproximadamente 4000 kg.ha<sup>-1</sup> sob irrigação, no entanto, demonstraram a importância do cultivo de plantas melhoradas, enfatizando a ação do melhoramento genético para a solução de problemas no setor produtivo da cadeia agroindustrial do caju.

O emprego das técnicas convencionais de melhoramento em plantas perenes é dificultado por um período juvenil longo, alta heterozigosidade dos melhores genótipos e ineficiência das técnicas convencionais em neutralizar o mascaramento do ambiente. Portanto, novos procedimentos devem ser incorporados como complemento a estes métodos, para que os avanços ocorram com maior frequência e eficiência. Entre os processos de regeneração *in vitro*, a embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção por apresentar algumas vantagens em relação à organogênese, como a alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção, plantio direto da muda obtida e possibilidade de transferência de genes (Litz e Gray, 1992).

Esforços devem ser concentrados na aplicação de algumas das técnicas pertinentes à biotecnologia, no melhoramento genético do cajueiro, tais como: micropropagação, regeneração de híbridos somáticos por meio de fusão de protoplasto, obtenção de haplóides, seleção *in vitro* de variantes somaclonais e transformação (Perl et al., 1996). Entretanto, a regeneração de plantas a partir da cultura de células e/ou tecidos é um pré-requisito para a aplicação destas técnicas de biotecnologia no melhoramento de plantas (Litz e Gray, 1992).

Os trabalhos para a obtenção de haplóides de cajueiro e para apoio a programas de melhoramento foram iniciados em 1996. A primeira fase do trabalho objetivou a determinação do estágio de desenvolvimento do botão floral mais indicado para a retirada de andrósporos livres, uninucleados e sem vacuolação citoplasmática. Esta fase, próxima à mitose, é a mais adequada para a obtenção de haplóides em pimentão (Luz, 1995) e foi usada como referência para o cajueiro. Embora tenham sido desenvolvidos protocolos para diversas espécies tropicais como a manga, Anacardiaceae como o cajueiro, não se registrou nenhum protocolo para o cajueiro, razão pela qual objetivou-se viabilizar um protocolo para a obtenção de plantas haplóides de cajueiro anão precoce, através de cultura de anteras.

## Material e Métodos

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e Fisiologia Vegetal, em Fortaleza e na Estação Experimental de Pacajus da Embrapa Agroindústria Tropical. Utilizaram-se botões florais no estágio uninucleado, antes da primeira mitose da gametogênese, do clone CCP 76 (Oliveira et al., 1997), com tamanhos variando de 2,8 a 3,2 mm de comprimento e 2,3 a 2,2 mm de diâmetro. No caso de flores perfeitas, foram utilizadas as anteras maiores (Figura 1) e no caso de flores estaminadas, as anteras menores (Figura 2).

A desinfestação superficial dos botões florais foi feita em fluxo laminar, com álcool 70%, por 30 segundos; com solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos e com 3 lavagens seguidas em água destilada. Reuniram-se as anteras em placa de Petri esterilizada, contendo 25 mL do meio de cultura correspondente.

Realizaram-se seis experimentos, visando a testar o ambiente e diferentes meios de cultura para o cultivo de anteras. As avaliações foram realizadas considerando-se as seguintes variáveis: 1) Grau de desenvolvimento (D1: anteras pouco desenvolvidas,

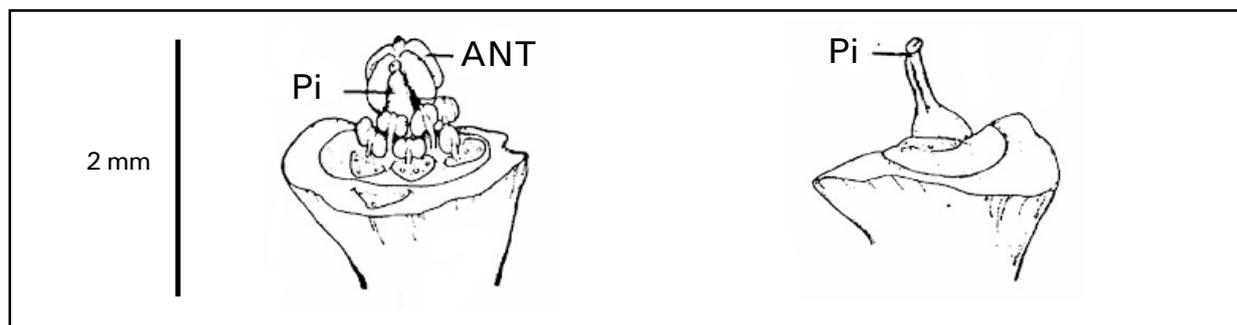
com oxidação; D2: anteras pouco desenvolvidas, sem oxidação, D3: anteras com aumento de tamanho em relação ao início da cultura, sem desenvolvimento de calo e D4: anteras com presença de calos); 2) Frequência de oxidação e 3) Frequência de contaminação.

Os experimentos foram os seguintes:

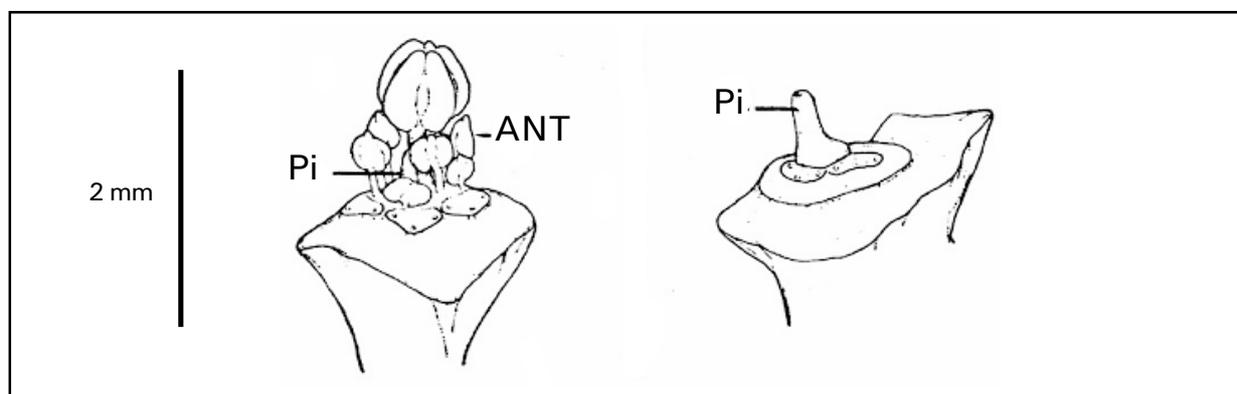
### Experimento 1

O objetivo deste estudo foi testar a presença de luz e a movimentação de anteras em seu desenvolvimento. O experimento foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (no escuro, no claro com movimentação e no claro sem movimentação das anteras dentro das placas de Petri), 4 repetições e 30 anteras por placa.

As anteras foram inoculadas em placa de Petri, contendo o meio de cultura FHGA (Tabela 1) e mantidas em sala de crescimento a 25°C. No tratamento com movimentação de anteras, estas eram trocadas de lugar a cada quatro dias, dentro da mesma placa de Petri, ocupando uma porção intacta do meio. Aos 20 dias da inoculação, avaliou-se o grau de desenvolvimento e as frequências de oxidação e de contaminação das anteras.



**Figura 1** - Botões florais (flores perfeitas) dos quais utilizaram-se as anteras maiores. Pi=pistilo e ANT=antera (Oliveira et al., 1997).



**Figura 2** - Botões florais (flores estaminadas) dos quais utilizaram-se as anteras menores. Pi=pistilo e ANT=antera (Oliveira et al., 1997).

## Experimento 2

As anteras foram inoculadas em quatro tipos de meio de cultura (Tabela 1): 1.- MS/4 + carvão ativado (250mg.L<sup>-1</sup>); 2 - MS/4 + ácido ascórbico (150 mg.L<sup>-1</sup>); 3 - FHGA e 4 - Basal. Aos meios, adicionaram-se 2,4-D (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (0,1mg.L<sup>-1</sup>).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, 4 repetições e 8 anteras por placa de Petri. Em função dos resultados obtidos no experimento 1, as anteras foram mantidas em câmaras tipo BOD (1000 lux e 35°C) e transferidas para outra placa com o mesmo meio, a cada quatro dias, sendo realizada uma transferência a cada dois dias, na mesma placa. Vinte dias após a inoculação avaliou-se a frequência de contaminação e de oxidação e o grau de desenvolvimento das anteras.

**Tabela 1** - Meios para cultura de anteras de cajueiro anão precoce CCP 76.

Componentes	FHGA (mgL <sup>-1</sup> )	Basal (mgL <sup>-1</sup> )	MS (mgL <sup>-1</sup> )	MS/4 (mgL <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>				
KNO <sub>3</sub>	900	1415	1900	475,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	232	-	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	93	370	92,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165	-	1650	412,5
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	83	440	110,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	200	170	42,5
<b>Micronutrientes</b>				
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	5,000	22,300	5,575
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,600	5,000	8,600	2,150
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	5,000	6,200	1,550
KI	-	0,400	0,830	0,207
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	22,300	-	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,250	0,012	0,250	0,062
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,012	0,025	0,006
CoCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	0,025	0,012	0,025	0,006
Na <sub>2</sub> E D T A	37,300	0,373	37,300	9,325
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,800	0,278	27,800	6,950
<b>Vitaminas e aminoácidos</b>				
Mio-inositol	1000	300	100	100
Piridoxina (HCl)	-	0,5	0,5	0,5
Ácido nicotínico	-	0,5	0,5	0,5
Tiamina (HCl)	4	2,5	0,1	0,1
Pantotenato de Ca	-	0,25	-	-
Biotina	-	0,25	-	-
Glicina	-	1,0	2,0	2,0
Ácido ascórbico	-	0,5	-	-
Glutamina	975	1.000,0	-	-
U2.5 aminoácido	332,5	-	-	-
Sacarose	-	-	30.000,0	30.000,0
Agar	7.000,0	7.000,0	5.000,0	5.000,0
PH	5,6	4,3-4,5	5,6-5,8	5,6-5,8

## Experimento 3

Os explantes foram inicialmente cultivados no meio MS/4 + carvão ativado (250 mg.L<sup>-1</sup>), 2,4-D (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) e também no meio Basal, com 2,4-D (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) por 3 dias (Tabela 1). A seguir foram transferidos para um dos seguintes meios: MS/4 + carvão ativado (250 mg.L<sup>-1</sup>) e Basal (Tabela 1).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com 2 tratamentos, 8 repetições e 8 anteras por placa de Petri. As anteras foram mantidas em câmara tipo BOD (1000 lux e 35°C), durante 3 dias, nos meios da primeira fase. Após este período, foram transferidas para os meios da segunda fase. A cada dois dias foi realizada uma transferência dentro da mesma placa de Petri e a cada quatro dias as anteras foram transferidas para uma nova placa. Vinte dias após a inoculação, avaliou-se a frequência de contaminação, de oxidação e o grau de desenvolvimento das anteras.

## Experimento 4

O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de anteras submetidos à variação na concentração de Thidiazuron (TDZ). As anteras foram inoculadas nos seguintes meios: Basal, adicionado com TDZ 0,005 µM; Basal, adicionado com TDZ 4,5 µM; MS/4, adicionado com TDZ 0,005 µM e MS/4, adicionado com TDZ 4,5 µM (Tabela 1). Todos os meios foram acrescidos com carvão ativado (250 mg.L<sup>-1</sup>).

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com 4 meios de cultura, 4 repetições e 8 anteras por placa de Petri.

As anteras foram colocadas nestes meios em câmara tipo BOD, no escuro (35°C), durante 6 dias e, então, transferidas para os meios correspondentes acrescidos de cinetina (0,5 µM) e mantidas no claro. Após vinte dias do isolamento, as anteras foram avaliadas de acordo com o grau de desenvolvimento e as frequências de oxidação e de contaminação apresentadas.

## Experimento 5

Utilizaram-se os mesmos meios de cultura do experimento 4, adicionados com carvão ativado (250 mg.L<sup>-1</sup>), com 4 meios de cultura, 4 repetições e 8 anteras por placa de Petri. Mas as anteras foram colocadas em câmaras tipo na BOD, com 1.000 lux

e 35°C. No sétimo dia do isolamento, as anteras foram transferidas para o mesmo meio de cultura, com inclusão de cinetina (0,5 µM). Após seis, doze e trinta dias, as anteras foram avaliadas de acordo com o grau de desenvolvimento e as freqüências de contaminação e de oxidação apresentadas.

### Experimento 6

O objetivo deste experimento foi utilizar os três melhores meios identificados através dos experimentos anteriores, com acréscimo dos hormônios: BAP e 2,4-D. As anteras foram inoculadas em três meios de cultura (Tabela 1): 1- MS/4 + carvão ativado (250 mg.L<sup>-1</sup>) + cinetina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) + 2,4-D (0,2 mg.L<sup>-1</sup>); 2-MS + cinetina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) + 2,4-D (2,2 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (1,12 mg.L<sup>-1</sup>) e 3- Basal + carvão ativado (250 mg.L<sup>-1</sup>) + 2,4-D (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + ácido ascórbico (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) + pantotenato de Ca (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) + cinetina (0,1 mg.L<sup>-1</sup>).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (meios de cultura, cada qual com duas situações: a 1ª sem movimentação e a 2ª com movimentação das anteras), 3 repetições e 5 anteras por placa de Petri. Nas repetições 2; 4 e 6, as anteras foram submetidas a três movimentações na mesma placa e a subsequente transferindo-as para outra placa com o mesmo meio e avaliadas após seis, doze e trinta dias do isolamento. As anteras foram colocadas na BOD, no escuro (28°C) e avaliadas de acordo com o grau de desenvolvimento e as freqüências de oxidação e de contaminação.

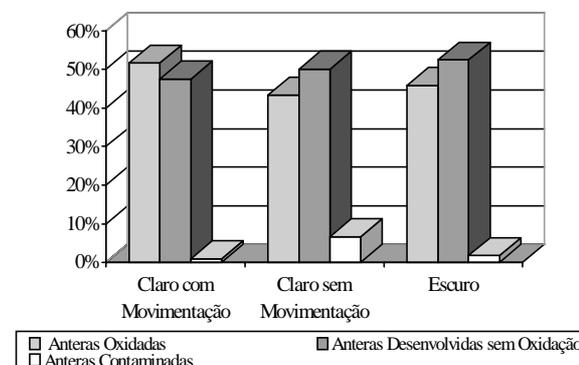
## Resultados e Discussão

### Experimento 1

As anteras conduzidas no escuro apresentaram maior grau de desenvolvimento (Figura 3). Este resultado também foi observado por Luz (1995) e Moro (1987) ao estudarem anteras de pimentão e de milho.

A maior freqüência de oxidação foi observada nas anteras conduzidas no claro com movimentação. Este resultado pode estar relacionado com as quantidades de fenóis das anteras que, quando movimentadas, foram estimuladas a liberarem mais esta substância no meio de crescimento. A freqüência de oxidação interferiu diretamente no crescimento das anteras, pois, de acordo com Torres et al. (1999), os produtos da oxidação são tóxicos ao explante. A

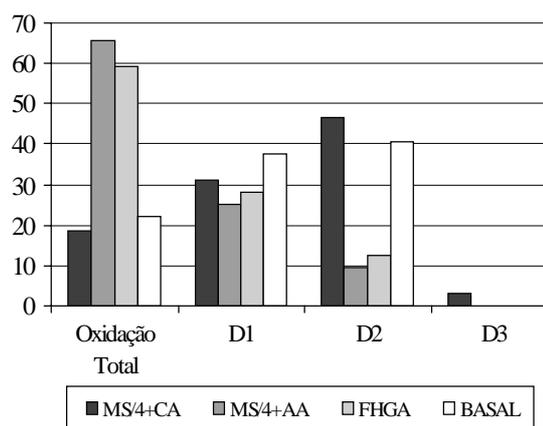
menor freqüência de contaminação foi observada nas anteras conduzidas no claro com movimentação, possivelmente por estas estarem sempre em contato com uma porção intacta do meio ou pela menor contaminação externa, em função da menor manipulação dos explantes.



**Figura 3** - Freqüências de oxidação, de contaminação e grau de desenvolvimento de anteras conduzidas no claro e escuro em meio de cultura FHGA.

### Experimento 2

Constatou-se variação no tamanho das anteras em até três vezes nos meios 1; 2 e 4 e em até duas vezes no meio 3 (Figura 4). A oxidação foi menor no meio 1 e maior no meio 2. Isto evidencia a eficiência do carvão ativado no controle de oxidação. Torres et al. (1999) menciona que este escurece o meio, impedindo a incidência de luz na base do explante, reduzindo a oxidação.



**Figura 4** - Freqüência de oxidação e grau de desenvolvimento de anteras inoculadas em quatro meios de cultura.

Não ocorreu contaminação em nenhum dos tratamentos, possivelmente, devido à movimentação

das anteras dentro da placa e à troca de meio a cada quatro dias. No meio MS/4 + carvão ativado, verificou-se melhor desenvolvimento das anteras quando comparadas com os demais, provavelmente, em função da menor oxidação. Mesmo assim, neste meio foram observados indivíduos pouco desenvolvidos, com e sem oxidação e com desenvolvimento intermediário sem oxidação.

### Experimento 3

Houve maior oxidação no meio sem adição carvão ativado, confirmando os resultados verificados no experimento anterior (Tabela 2). O fato das anteras serem transferidas de lugar, dentro da placa, diariamente e transferidas para meio novo a cada três dias pode ter influenciado neste resultado.

**Tabela 2** - Frequências de oxidação, de contaminação e grau de desenvolvimento de anteras conduzidas em dois meios de cultura.

Tratamentos	Oxidação Total(%)	Contaminação Total(%)	D1 (%)	D2 (%)	D3 (%)
1ª Avaliação					
MS/4 + CA	14,06	14,06	23,44	43,75	4,68
Basal	28,12	7,81	56,25	7,82	-
2ª Avaliação					
MS/4 + CA	-	-	17,40	39,13	43,47
Basal	70,73	-	29,27	-	-
3ª Avaliação					
MS/4 + CA	13,88	-	-	33,34	52,78
Basal	83,33	-	16,67	-	-

### Experimento 4

A oxidação dos explantes foi observada após 23 dias do isolamento, com baixas frequências: 28,57% no meio 2 e 3,22% no meio 3. Não houve contaminação (Tabela 3).

Constatou-se que o meio 3, acrescido com TDZ (0,005 µM), apresentou melhor grau de desenvolvimento. Luz (1995) constatou, em anteras de pimentão, queda do número de embriões somáticos para a concentração de 4,5 µM, o que justifica um melhor desenvolvimento no meio cuja concentração de TDZ foi 0,005 µM. Na primeira avaliação, após seis dias no escuro, verificou-se que 50% das anteras do meio 3 apresentaram grau 3 de desenvolvimento. Na segunda avaliação estas porcentagens foram elevadas, atingindo 100% no meio 3. Este resultado está em conformidade com Luz (1995), que obteve anteras de pimentão com melhores desenvolvimentos

quando mantidas inicialmente no escuro. No entanto, por ocasião da terceira avaliação, este percentual apresentou decréscimo em torno de 50%. Possivelmente, as anteras necessitavam de modificações no meio quanto às suas concentrações ou proporções ou, ainda, de um outro tipo de meio que favorecesse seu desenvolvimento nesta nova fase, como aconteceu com Moro (1987) e Dumas De Vaulx et al. (1981) ao estudarem anteras de milho e pimentão, respectivamente.

**Tabela 3** - Frequências de oxidação e grau de desenvolvimento de anteras conduzidas em dois meios de cultura com variações nas concentrações de TDZ e submetidas a três avaliações.

Tratamentos	Oxidação Total(%)	D1 (%)	D2 (%)	D3 (%)
1ª Avaliação				
Basal+0,005µM TDZ	-	50,00	25,00	25,00
Basal+4,5µM TDZ	-	50,00	-	50,00
MS/4+0,005 µM TDZ	-	-	50,00	50,00
MS/4+4,5µM TDZ	-	25,00	25,00	50,00
2ª Avaliação				
Basal+0,005µM TDZ	-	-	25,00	75,00
Basal+4,5µM TDZ	-	25,00	12,50	62,50
MS/4+0,005 µM TDZ	-	-	-	100,00
MS/4+4,5µM TDZ	-	-	25,00	75,00
3ª Avaliação				
Basal+0,005µM TDZ	-	-	54,54	45,46
Basal+4,5µM TDZ	28,57	14,28	42,85	14,30
MS/4+0,005µM TDZ	3,22	19,36	25,80	51,62
MS/4+4,5µM TDZ	-	-	-	100,00

### Experimento 5

Neste experimento 50% das anteras apresentaram grau de desenvolvimento D2 no meio MS/4 (Tabela 4). Também os explantes permaneceram isentos de oxidação.

**Tabela 4** - Frequências de contaminação e grau de desenvolvimento de anteras conduzidas em dois meios de cultura com variações nas concentrações de TDZ e submetidas a duas avaliações.

Tratamentos	Contaminação Total(%)	D1 (%)	D2 (%)	D3 (%)
1ª Avaliação				
Basal+0,005 µM TDZ	50,00	50,00	-	-
Basal+4,5 µM TDZ	25,00	75,00	-	-
MS/4+0,005 µM TDZ	25,00	25,00	50,00	-
MS/4+4,5 µM TDZ	25,00	25,00	50,00	-
2ª Avaliação				
Basal+0,005 µM TDZ	18,52	81,48	-	-
Basal+4,5 µM TDZ	14,29	85,71	-	-
MS/4+0,005 µM TDZ	28,00	72,00	-	-
MS/4+4,5 µM TDZ	10,34	89,66	-	-

Como este experimento foi conduzido no claro, as anteras não receberam o choque inicial para estimular a indução de crescimento, diferentemente do que aconteceu com as anteras de brócolis em experimento conduzido por Arnison et al. (1976). Obteve-se o melhor resultado quando se utilizou o meio com maior concentração de TDZ (4,5 µM). A frequência de contaminação chegou a 50% no meio 1. Este resultado pode ser atribuído à manipulação, uma vez que o experimento 4 foi conduzido de maneira semelhante a este, porém sem apresentar contaminação. Também Torres et al. (1999) relataram que elevado grau de assepsia é condição limitante em qualquer situação, já que fungos e bactérias encontram, no meio nutritivo utilizado, ambiente apropriado para se desenvolverem rapidamente.

#### Experimento 6

Constatou-se que as anteras movimentadas no meio MS apresentaram calos após trinta dias da inoculação (Tabela 5).

Em cortes anatômicos realizados, verificou-se que os calos foram resultantes de multiplicação de células tanto da superfície externa das anteras quanto do seu interior. Porém, não foram observadas células embriogênicas. Nas anteras movimentadas, verificou-se baixa frequência de contaminação. A menor frequência de oxidação ocorreu no meio MS com movimentação das anteras (7,14%).

O desenvolvimento no meio MS foi crescente até a segunda avaliação, chegando a 71,44% de anteras com calo (Tabela 6). A partir da terceira avaliação este grau decresceu. Este resultado pode indicar a necessidade de mudança de meio de cultura para estes explantes; de acordo com o evidenciado por Moro (1987) e Dumas De Vaulx et al. (1981).

### Conclusões

As anteras apresentam melhor desenvolvimento quando mantidas inicialmente no escuro e transferidas de meio. Os meios MS e MS/4 são os mais favoráveis para o desenvolvimento das anteras.

**Tabela 5** - Frequências de oxidação, de contaminação e grau de desenvolvimento de anteras movimentadas conduzidas em três meios de cultura e submetidas a três avaliações.

	Oxidação Total (%)	Contaminação Total (%)	D1 (%)	D2 (%)	D3 (%)	D4 (%)
1ª Avaliação						
MS/4 + CA	-	7,14	21,42	35,72	35,72	-
MS+2,4D+BAP	7,14	-	57,14	-	35,72	-
Basal+CA	40,00	-	40,00	20,00	-	-
2ª Avaliação						
MS/4 + CA	64,28	-	-	14,28	14,30	71,44
MS+2,4D+BAP	14,28	-	-	14,28	42,87	28,57
Basal+CA	85,72	-	14,28	-	-	-
3ª Avaliação						
MS/4 + CA	63,64	-	-	18,18	-	18,18
MS+2,4D+BAP	42,85	-	-	7,15	-	50,00
Basal+CA	64,28	-	35,72	-	-	-

**Tabela 6** - Frequências de oxidação, de contaminação e grau de desenvolvimento de anteras sem movimentação conduzidas em três meios de cultura e submetidas a uma avaliação.

	Oxidação Total (%)	Contaminação Total (%)	D1 (%)	D2 (%)	D3 (%)	D4 (%)
1ª Avaliação						
MS/4 + CA	26,66	13,34	60,00	-	-	-
MS+2,4D+BAP	60,00	-	-	-	-	40,00
Basal+CA	73,33	-	20,00	-	6,67	-

O carvão ativado é eficiente na inibição da oxidação de anteras que interferiu diretamente no crescimento das mesmas. O Thidiazuron na concentração 0,005  $\mu$ M promove melhor desenvolvimento das anteras.

## Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J. I. L.; ARAÚJO, F. E.; BARROS, L. M. Características do clone EPACE CL 49 de cajueiro. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUARIA DO CEARÁ. **Relatório Anual de Pesquisa 1980 – 1992**. Fortaleza: EPACE, 1992. p.160-165.
- ALMEIDA, J. I. L.; ARAÚJO, F. E.; LOPES, J. G. V. **Evolução do cajueiro anão precoce na Estação Experimental de Pacajus, Ceará**. Fortaleza: EPACE, 1993. 17p. (EPACE, Documentos, 6).
- ALMEIDA, J. I. L.; LOPES, J. G. V.; ARAÚJO, F. E. de. **Produtor de caju**. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha - Instituto Centro de Ensino Tecnológico, 2002. 56p. (Cadernos Tecnológicos).
- ARNISON, P. G.; BOLL, W. G. The effect of 2,4-D and kinetin on the morphology, growth, and cytochemistry of peroxidase of cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). **Canadian Journal of Botany**, v. 54, p.1847-1856, 1976.
- BARROS, L. M. Melhoramento. In: LIMA, V. P. M. S. (Ed.) **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB-ETENE, Banco do Nordeste do Brasil, 1988. cap. 3, p. 321-356.
- BARROS, L. M.; PIMENTEL, C. R. M.; CORRÊA, M. P. F.; MESQUITA, A. L. M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1993. 65p. (EMBRAPA – CNPAT. Circular Técnica, 1)
- DUMAS DE VAULX, R. ; CHAMBONNET, D. ; POCHARD, E. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d'obtention de plantes chez différents genotypes par des traitements à 35°C. **Agronomie**, v.1, n.2. p. 859 – 864, 1981.
- LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Organogenesis and Somatic Embryogenesis. In: HAMMERSCHLAG, F. A. ;LITZ, R. E. (Ed.) **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. 2 ed. Cambridge: University Press, 1992. cap. 1, p. 3-34.
- LUZ, J. M. Q. **Embriogênese somática in vitro em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1995. 65f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MORO, J. R. Biotecnologia e melhoramento genético de milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 13, p. 343 – 372.
- OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A.; BUENO, D. M. Recomendações técnicas para a diferenciação de flores perfeitas e estaminadas do clone CCP 76 de *Anacardium occidentale* L. em fase inicial do desenvolvimento e utilização das anteras em cultura de tecido. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997, Gramado. **Programa e Resumo**. Gramado: REDBIO, 1997. p. 158.
- PERL, A.; GOLLOP, R.; LIPSKY, A.; HOLLAND, D.; SAHAR, E. N.; OR, E.; ELYASI, R. Regeneration and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). In: PLANT TISSUE CULTURE. BIOTECHNOLOGY 2., 1996. p.187-193.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1999. v.2.