



**CULTURA “IN VITRO” DE EMBRIÕES E
SEGMENTOS NODAIS DO CAFEIEIRO
(*Coffea arabica* L.)**

LÍLIAN DE SOUSA RIBEIRO

2001

51748 MFN

3651 9

LÍLIAN DE SOUSA RIBEIRO

CULTURA "IN VITRO" DE EMBRIÕES E SEGMENTOS NODAIS DO
CAFEIRO (*Coffea arabica* L.)



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Ribeiro, Lilian de Sousa

Cultura "in vitro" de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica*
L.) / Lilian de Sousa Ribeiro. -- Lavras : UFLA, 2001.

73 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica* L. 2. Embrião. 3. Explantes. 4. Meio de cultura. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.733

LÍLIAN DE SOUSA RIBEIRO

**CULTURA “IN VITRO” DE EMBRIÕES E SEGMENTOS NODAIS DO
CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

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

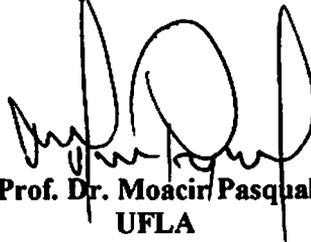
APROVADA em 05 de março de 2001

Prof. Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes

UFLA

Pesq. Dr. André Barretto Pereira

CEPLAC



Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

Ao meu esposo Marciel pelo apoio, pela compreensão e paciência, mesmo à distância, na sua maneira de amar ...

Aos meus filhos Filipe e Leticia por entenderem a “mãe” quase sempre ausente e por serem hoje a razão de todos os meus esforços.

DEDICO

Ao meu PAI, Ernesto, que em momento algum deixou de acreditar em mim, e soube estar sempre presente na minha vida de uma maneira tão forte, com o seu amor inabalável ao qual devo todas as minhas conquistas.

A minha MÃE, Luzia, por seu carinho de mãe.

A minha AVÓ, Aguiamar (*in memoriam*). Nos momentos de quase desistência, senti sua mão sobre minha cabeça, afagando e protegendo.

Às minhas irmãs, Gladys e Lenira, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos meus sobrinhos e afilhadas, Manuela e Gabriel, Sabrina e Natália, pelo sorriso sempre presente.

Ao meu cunhado Paulo César pelo exemplo profissional, ensinamentos, amizade e apoio em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus padrinhos, José Hernani e Terezinha, que mesmo à distância, sempre estiveram muito próximos, através das orações e palavras de conforto.

À minha Tia Lúcia pelo estímulo, apoio e carinho durante a realização deste curso.

À minha prima e amiga Patricia, que sempre esteve junto a mim, em todos os momentos deste percurso.

Aos meus amigos, Delva, Lú e William, pelo carinho, amizade e por estarem sempre por perto quando precisei.

OFEREÇO

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução Geral	01
2 Referencial Teórico	02
3 Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 2: Cultura de embriões de <i>Coffea arabica</i> L.	24
1 Resumo	24
2 Abstract	25
3 Introdução	26
4 Material e Métodos	28
5 Resultados e Discussão	32
6 Conclusões	45
7 Referências Bibliográficas	46
CAPÍTULO 3: Micropropagação de <i>Coffea arabica</i> L. por meio de cultura de tecidos	49
1 Resumo	49
2 Abstract	50
3 Introdução	51
4 Material e Métodos	54
5 Resultados e Discussão	55
6 Conclusões	70
7 Referências Bibliográficas	70

LISTA DE ABREVIATURAS

GA₃: Ácido giberélico

AIB: Ácido indolil-3-butírico

ANA: Ácido naftaleno acético

BAP: 6-benzilaminopurina

AIA: Acido Indol Acético

2iP: N-isopentenilaminopurina

PVP: Polivinilpirrolidone

N: Nitrogênio

MS: Meio básico de Murashige e Skoog (1962)

WPM: Meio básico de Lloyd e McCown (1980)

PMFPA: Peso da matéria fresca da parte aérea

PMFSR: Peso da matéria fresca do sistema radicular

PMST: Peso da matéria seca total

CPA: Comprimento da parte aérea

CR: Comprimento de raiz

NTB: Número total de brotos

NB>1cm: Número de brotos maiores que 1 centímetro

%CAL: Porcentagem de calos

PMFCAL: Peso da matéria fresca de calos

PMSCAL: Peso da matéria seca de calos

CV: Coeficiente de variação

R²: Coeficiente de determinação

RESUMO

RIBEIRO, Lilian de Sousa. **Cultura *in vitro* de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** Lavras: UFLA, 2001. 73 p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)*

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos e segmentos nodais de *Coffea arabica* L. Tanto para embriões do cultivar Acaiaá Cerrado MG 1474, como para segmentos nodais do cultivar Rubi foram testadas duas fontes de nitrogênio (KNO_3 e NH_4NO_3) nas seguintes concentrações do meio MS de cultura: 0, 25, 50, 75, 100%. O desenvolvimento de segmentos nodais de *Coffea arabica* L. cultivares Caturra Amarelo, Acaiaá, Rubi e Catuai, foi estudado em 4 meios de cultura (MS, WPM, White e Knudson). Estudou-se também o desenvolvimento de embriões de *Coffea arabica* L. cultivares Rubi, Topázio, Icatú e Acaiaá inoculados em 4 meios de cultura (MS, WPM, White e Knudson). Para todos os experimentos os meios básicos de cultura tiveram seus pHs ajustados para 5,8 antes de serem autoclavados a 121°C e 1,1 atm por 20 minutos, e foram solidificados com 7,0 g.L⁻¹ de ágar. Os experimentos foram montados em câmara de fluxo laminar e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ±1°C e fotoperíodo de 16 horas sob 35 $\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Na cultura de embriões de *C. arabica* L. a concentração de Nitrato de Amônio do meio MS pode ser reduzida em até 50%. A utilização de Nitrato de Potássio resultou num melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular quando comparado ao meio sem de KNO_3 . Embriões de *Coffea arabica* L. cultivares Rubi e Acaiaá, se desenvolvem melhor quando colocados nos meios básicos de cultura MS e Knudson. O meio básico de cultura WPM é o mais eficiente para a cultura de segmentos nodais de explantes de *Coffea arabica* L. Segmentos nodais das cultivares Caturra e Rubi apresentam melhor comportamento *in vitro*, quando comparados com as demais cultivares.

*Comitê Orientador: Moacir Pasqual - UFLA (Orientador), Antônio Nazareno Guimarães Mendes - UFLA

RIBEIRO, Lilian de Sousa. *In vitro* embryos and nodal segments culture of coffee (*Coffea arabica* L.) Lavras: UFLA, 2001. 73 p. (Dissertation - Master of Science in Agronomy/Crop Science)*

ABSTRACT

The *in vitro* immature embryos and nodal segments of *Coffea arabica* L. development were studied. Either for cultivar Acaiá MG 1474 embryos as for nodal segments of cultivar Rubi, two sources of nitrogen were tested (KNO_3 and NH_4NO_3) in the following MS culture medium concentrations: 0, 25, 50, 75, 100%. Nodal segments growing of four *C. arabica* cultivars (Caturra Amarelo, Acaiá, Rubi and Catuai), were studied in four culture media (MS, WPM, White and Knudson). It was also studied the embryos development of Rubi, Topazio, Icatú and Acaiá *C. arabica* cvs inoculated in the same four culture media. For all the experiments, culture media pH had been adjusted at 5.8 before autoclavage at 121°C and 1,1 atm for 20 minutes, and were solidified with $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ ágar. Inoculation was made aseptically in laminar flow chamber and explants kept at growth room with $25 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature and 16 hours/day under $35 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light intensity. Ammonium Nitrate concentration on the MS medium can be reduced up to 50% in *C. arabica* embryos culture. Potassium Nitrate use resulted in better development of aerial part and root system when compared to the media absent of KNO_3 . MS and Knudson media promoted better embryos development of Rubi and Acaiá *C. arabica* cvs. WPM medium was the most efficient for the *C. arabica* nodal segments culture. Nodal segments of Caturra and Rubi cultivars presented better behavior *in vitro*, when compared with the others cultivars.

*Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Antônio Nazareno Guimarães Mendes - UFLA

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo mercado consumidor de café do mundo. A produção média mundial é estimada em 112,8 milhões de sacas, produzidas por mais de 50 países, nas regiões tropicais da América Latina, África e Ásia. Para muitos destes países, o café é a principal fonte de renda (Sreenath, 2000).

Dentro do gênero *Coffea* existem duas espécies comercialmente importantes *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre , sendo que cerca de 70% dos plantios comerciais mundiais são do tipo arabica, principalmente pela qualidade superior de sua bebida. A espécie *C. canephora*, também conhecida como café robusta, participa com 30% deste mercado. No Brasil, cerca de 82% da produção são provenientes de lavouras formadas com cultivares da espécie *Coffea arabica* L. e 18% de cultivares da espécie *C. canephora* (Melo, Bartholo e Mendes, 1998).

A cafeicultura mundial tem sido grandemente beneficiada pelo sucesso dos programas de melhoramento genético, que têm colocado, à disposição do agricultor, cultivares de alta capacidade produtiva. Contudo, os ganhos esperados no futuro provavelmente serão menores devido ao estágio de melhoramento em que estão as linhagens disponíveis atualmente. Novas estratégias de melhoramento deverão ser utilizadas para continuar obtendo sucesso (Pereira, 2000).

Para melhorar a situação atual, uma alternativa é a formação de lavouras comerciais utilizando híbridos F_1 , aproveitando a heterose normalmente

observada nas hibridações, o que representa grande economia de tempo, principalmente se for comparada com o longo ciclo de seleção necessário para obtenção de linhagens. A utilização da propagação vegetativa na formação dos plantios clonais de *C. arabica* torna-se uma realidade, garantindo a uniformidade do povoamento e manutenção do ganho genético obtido na seleção.

A cultura de tecidos vegetais pode ser usada como uma técnica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento de plantas e reprodução de exemplares com características agronômicas desejáveis, tais como resistência a pragas, doenças e o acúmulo de substâncias ativas de interesse, como o teor de cafeína (Scragg, 1994; França, 1999). Entre outras aplicações da cultura de tecidos, ressalta-se a de ser instrumento de pesquisa valioso no estudo das plantas, minimizando e controlando variáveis relacionadas com fatores ambientais. A cultura de tecidos tem grande importância para obtenção de plantas transgênicas.

A micropropagação do cafeeiro se perfila como sendo uma tecnologia para a conservação dos recursos genéticos através de bancos de germoplasma e propagação e distribuição do material híbrido selecionado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Taxonômicos da espécie em estudo

A espécie *C. arabica* é uma espécie vegetal pertencente à família Rubiaceae, originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, em região restrita e marginal às demais espécies. A faixa de altitude correspondente

é entre 1000 e 2000 metros e algumas regiões limítrofes estão entre 8 e 12° de latitude norte e 40 e 42° de longitude leste (Mendes, 1998).

A espécie *C. arabica* L. é um arbusto polimorfo, com numerosas variedades e cultivares nos países produtores. A variedade *Arabica* ou *Típica* foi a primeira observada, sendo a base para a descrição da espécie. O arbusto pode atingir 4 metros de altura, apresenta raiz profunda e amplamente ramificada nas primeiras camadas do solo. Os ramos primários são longos e flexíveis, havendo abundante ramificação secundária e terciária. As folhas são de cor verde escura, opostas, elípticas, lâmina brilhante e domácias visíveis. As flores são agrupadas em inflorescências axilares, protegidas por caulículo formado por dois pares de bractéolas. O número de flores varia de 2 a 20 por axila, dependendo do vigor da planta e das condições de ambiente. Os lobos da corola são em número de 5 e têm estames aderidos à sua base. O ovário é ínfero, com duas lojas, cada uma geralmente com apenas um único óvulo. O estilo é simples e bifido (2 lobos estigmáticos). O nectário é discóide. Os grãos de pólen são numerosos, globosos, com exina grossa e lisa. Os frutos são do tipo drupa, de cor vermelha ou amarela, de acordo com a variedade, superfície lisa e brilhante, exocarpo delgado (casca), mesocarpo carnoso (mucilagem) e endocarpo fibroso (pergaminho). As sementes são oblongas, plano-convexas, esverdeadas, cobertas com uma película prateada, que corresponde aos vestígios do tegumento do óvulo. O endosperma é duro e resistente, sendo a hemicelulose um dos principais materiais de reserva, como compostos de proteínas, cafeína, óleo, açúcares, dextrina, celulose, ácido clorogênico e várias substâncias minerais. O embrião é pequeno e se localiza na base do endosperma, possui duas folhas cotiledonares cordiformes e justapostas, com eixo hipocotiledonar curto e plúmula reduzida (Mendes, 1998).

Em vista do reduzido tamanho do embrião, as sementes demoram mais de um mês para germinar, mesmo em condições ótimas de ambiente (em média, a germinação ocorre em dois meses). Apenas a camada interna do endosperma é consumida durante o processo de germinação (Mendes, 1998).

Na axila das folhas cotiledonares ocorrem várias gemas que podem originar ramos ortotrópicos (verticais), caso a haste principal seja destruída. Também nas axilas das folhas verdadeiras, até o nono ou décimo par, somente ocorrem gemas vegetativas que originam ramos ortotrópicos. A partir do décimo primeiro par de folhas surge apenas uma única gema maior por axila, que originará o ramo plagiotrópico e várias gemas menos desenvolvidas, que darão origem aos ramos ortotrópicos. Quando a planta “perde” um ramo plagiotrópico, não é capaz de regenerá-lo, e sim ocorrem ramos ortotrópicos na axila do ramo perdido (comumente denominados “ramos ladrões”) (Mendes, 1998).

Nos ramos plagiotrópicos, somente surgem gemas produtoras de ramos plagiotrópicos de ordem superior ou de inflorescências nas axilas de suas folhas. Essa característica define o dimorfismo de ramos que ocorre no cafeeiro em razão de não se recuperar um ramo ortotrópico a partir de fragmentos de ramos plagiotrópicos.

A espécie *C. arabica* encerra um grande número de variedades e de mutantes, alguns amplamente empregados nos programas de melhoramento genético. É a espécie mais plantada em todo o mundo e a de maior importância econômica para o Brasil, sendo cultivada em todas as regiões produtoras do país, onde se obtém um produto de excelente qualidade de bebida (Mendes, 1998).

2.2 Cultura de Tecidos

Staritsky (1970) foi o primeiro a trabalhar com a cultura *in vitro* de café, utilizando segmentos ortotrópicos de duas espécies de *Coffea* em meio contendo sais inorgânicos, sacarose, tiamina, cisteína e auxina. O autor obteve rápida produção de calos na espécie *Coffea arabica*, e de embriões e plântulas na espécie *Coffea canephora*. Posteriormente, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos envolvendo o gênero *Coffea* (Bandel et al., 1975; Carvalho et al., 1974; Custer et al., 1980; De Pena, 1983; Monaco et al., 1977; Owuor, 1987; Sondahl et al., 1984 e 1991, Caldas et al., 1998, Thorpe e Patel, 1984).

As pesquisas a respeito de multiplicação *in vitro* de espécies de interesse econômico são cada vez mais promissoras. As dificuldades de multiplicação podem ser minimizadas por intermédio da propagação *in vitro*, pois esta permite a multiplicação rápida, seleção de material superior precocemente, produção em larga escala e pequeno espaço físico, por isso, é uma tecnologia adequada para cultura de ciclo longo, assim como o *C. arabica*, visando a formação de plantios clonais. Neste aspecto, diversos trabalhos foram realizados utilizando cultura de tecidos para propagação de variedades comerciais de café, regenerando plantas através de neoformação de gemas, 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).

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das características da cultura de tecidos vegetais. Todos estes fenômenos ocorrem mantendo-se os explantes em um meio de cultura. Daí a importância de conhecer detalhadamente quais são os componentes e propriedades dos meios de cultura, quais são os principais meios utilizados e qual a técnica a ser adotada para preparar um meio de cultura (Caldas et al., 1990).

Os meios de cultura, por constituírem parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes. Um grande passo foi dado em 1962, com a publicação de um trabalho por Murashige e Skoog (1962), que determinaram a concentração de sais, estabelecendo o tão conhecido meio 'MS'. Usa-se também o meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Loyd e McCown (1980), o meio básico Knudson (modificado por Ardite, 1967) e o meio básico White (1943), entre outros.

✕ Para cada tipo de explante, espécie e cultivar, o meio mais adequado e eficiente é variável. A extrapolação pura e simples em geral não traz os melhores resultados. Para determinar qual o melhor meio para cada caso, deve-se lançar mão de diversos ensaios. Dessa forma, os resultados serão melhores e a técnica de cultura de tecidos poderá ser utilizada conforme os objetivos propostos.

O meio da cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento. Basicamente, o meio da cultura fornece não só macro e micronutrientes, mas também um carboidrato (normalmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta normalmente fixa na atmosfera pela fotossíntese. Para proporcionar melhor desenvolvimento, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Diversos outros produtos, a exemplo de sucos de frutas, leite de coco, extratos de leveduras e proteínas hidrolisadas, foram usados no passado, substituindo vitaminas e aminoácidos ou mesmo como suplementos adicionais. Como é importante que o meio seja o mesmo todas as vezes que foram preparados, materiais que podem variar em sua composição devem ser evitados, mesmo que proporcionem resultados positivos (Pasqual, 1997).

2.3 Cultura de Embriões

✕ A cultura de embriões *in vitro* é utilizada para a regeneração de embriões oriundos de cruzamentos interespecíficos, multiplicação rápida do material selecionado e antecipação da época de plantio. Vários são os fatores que afetam a cultura de embriões *in vitro*, tais como a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e a própria remoção inadequada do embrião. ➤

Balaga e De Guzman (1972) trabalharam com cultura de embriões de plantas de coco, utilizando meio nutritivo com água de coco solidificado com ágar. Esta metodologia não possibilitou completar o ciclo de desenvolvimento do embrião até a formação da planta. Esta mesma técnica proporcionou sucesso quando o meio semi-sólido foi substituído por meio líquido, pois este último favorece a formação de raízes devido à maior dispersão das substâncias fenólicas, que são responsáveis pela inibição do crescimento e, conseqüentemente, redução na absorção dos nutrientes. Fisher e Tsa (1978) utilizaram carvão ativado adicionado ao meio, o qual funcionou como um mecanismo de absorção e diluição das substâncias fenólicas liberadas. ➤ Na cultura do café, os embriões *in vitro* passam por um processo de oxidação através do qual são liberadas substâncias fenólicas que impedem o desenvolvimento e crescimento do embrião. Essas substâncias podem atuar como inibidores do metabolismo celular, pois, no processo de oxidação, promovem redução na oferta de oxigênio disponível ao embrião, inibindo o seu desenvolvimento (Bewley e Black, 1982). ✕

➤ A composição do meio de cultura é extremamente importante para o desenvolvimento do embrião *in vitro*. É necessário que se determinem as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura, tais como macro e ➤

microelementos, sacarose e reguladores de crescimento.

Segundo Monnier (1978), a concentração ótima de sacarose para embriões imaturos é de 60 g.L^{-1} , atingindo alta osmolaridade no meio MS. Se o meio estiver deficiente em sacarose, formam-se plântulas disformes, com baixa probabilidade de sobrevivência, ou ocorre a não germinação dos embriões.

Os reguladores de crescimento são amplamente utilizados na cultura de embriões, quando estes são muito jovens. Estas substâncias possuem a capacidade de suprir as necessidades para a germinação, desenvolvimento e crescimento do embrião. Krasnyanski et al. (1992) cultivaram embriões de *Heliantus giganteus* L. em meio contendo MS com e sem adição dos reguladores de crescimento, constatando a importância dessas substâncias no microcultivo dessa espécie, que se mostraram essenciais para o seu desenvolvimento.

Os diferentes tipos de auxinas apresentam respostas diferentes quanto à sua ação, e se mostram instáveis em relação à ocorrência da organogênese. Na cultura do café, este regulador de crescimento mostrou ser eficaz na formação de embriões e na formação de calos (Guevara, 1987). George (1993) observou que altas concentrações de auxinas induzem a formação do embrião, porém o seu desenvolvimento se dá com baixas concentrações de auxinas.

Vários trabalhos mostram o efeito positivo das giberelinas quando adicionadas ao meio de cultura, proporcionando a iniciação e o desenvolvimento da zona meristemática radicular, e ainda estimulando o desenvolvimento da radícula já existente (Raghavan, 1976; Ackerson, 1984). As giberelinas atuam no processo de germinação, superação da dormência e no desenvolvimento de embriões. As giberelinas mais utilizadas são: ácido giberélico GA_3 e o GA_{4+7} .

* Segundo Válio (1976), na cultura do café, baixas concentrações de ácido giberélico e altas de citocininas promovem a germinação de embriões. Este mesmo autor verificou que altas concentrações de ácido giberélico podem causar a morte do embrião. *

Raghuramulu (1989) utilizou frutos imaturos da cultivar San Ramon cv. 573 (*C. arabica* L.), esterilizados com 0,5% de HgCl₂, por dois minutos, com embriões na fase de torpedo. O meio básico continha “MS” suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 1,0 mg.L⁻¹ de AIA. O processo de esterilização apresentou 100% de eficiência e foi similar ao utilizado em gemas axilares de *Coffea arabica* cv. Catuai, realizado por Sondahl et al. (1984), que observaram a presença de folhas na segunda semana de desenvolvimento e o primeiro par de folhas após a sétima semana. Colonna (1972) e Sondahl et al. (1984) obtiveram grande sucesso com embriões de robusta, dewerei, arabica e arabusta.

2.4 Micropropagação

A micropropagação do cafeeiro se perfila como sendo uma tecnologia para a conservação dos recursos genéticos através de bancos de germoplasma e na propagação e distribuição do material híbrido selecionado. Segundo Berthouly e Echeverri (1987), a partir de uma microestaca podem ser obtidos de 7 a 9 micronós a cada 80 dias, totalizando cerca de 20.000 plântulas por ano. O sucesso na micropropagação está diretamente relacionado com os componentes utilizados no meio de cultura, sendo que o regulador de crescimento é considerado fator predominante.

Zok e Dublin (1991) verificaram que as citocininas atuam diretamente no metabolismo fisiológico da planta, promovendo o início das brotações em diferentes espécies de *Coffea*. Estes autores constataram que a citocinina BAP e a auxina IBA são mais eficazes que a cinetina no que se refere à formação e ao crescimento de gemas por explante.

Altas concentrações de citocininas, em café, inibem o desenvolvimento de raízes e proporcionam o crescimento de gemas axilares, existindo uma concentração máxima para que se tenha uma resposta satisfatória no desenvolvimento de brotos, igual a 10 mg.L^{-1} , segundo Guevara (1987). Acima deste valor ocorre inibição no desenvolvimento.

Segundo Raghuramulu (1989), o maior problema na cultura *in vitro* de café é a oxidação provocada por fenóis, que induzem a produção de substâncias inibidoras do desenvolvimento celular, sendo necessária a utilização de substâncias antioxidantes, tais como: cisteína, carvão ativado e polivinilpirrolidone (PVP). Este mesmo autor, trabalhando com ramos ortotrópicos de aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento de cultivares de *C. arabica* L. e *C. canephora*, verificou que as melhores combinações dos reguladores de crescimento foram $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, promovendo maior crescimento e desenvolvimento do explante.

Dublin (1980) verificou aumento no número de brotações, quando utilizou BAP em concentrações que variam de 1,0 a $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo eficiente na multiplicação do híbrido interespecífico Arabusta.

Segundo Lu (1993), o TDZ também pode ter ação auxínica. Trabalhando com hipocótilo de gerânio, o autor verificou bons resultados na embriogênese somática, utilizando este hormônio em substituição à auxina. Este mesmo autor verificou que ao adicionar TDZ ao meio de cultura, o número de brotos foi maior que o observado em meio contendo citocinina, e as concentrações necessárias foram mínimas, variando de $0,002 \text{ mg.L}^{-1}$ a $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$. Zhou et al. (1994) verificaram que utilizando meio contendo $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ a $1,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, ocorria aumento na indução de calos embriogênicos, e quando os calos eram transferidos para meio contendo TDZ ou TDZ + ANA, observaram aumento de 25% na formação de embriões em relação ao meio utilizado sem o TDZ.

Inneco (1993), trabalhando com indução de brotações e calos em cotilédone de pimentão, utilizou $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ, o qual apresentou o mesmo efeito que $4,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. O TDZ possui maior atividade em relação às citocininas, pois não é facilmente degradado, sendo, portanto, mais estável e mais ativo.

2.5 Cultivares Melhoradas de *Coffea arabica* L.

A introdução do cafeeiro no Brasil se deu em 1727, na região norte do País, em Belém no Pará. Com a introdução de uma pequena quantidade de sementes e mudas da cultivar Arábica, o cafeeiro experimentou consideráveis avanços em termos de melhoramento genético, havendo grandes alterações nas cultivares plantadas até os dias atuais.

A partir da década de 1940, grandes avanços foram obtidos pelo programa de melhoramento genético do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas). Nas décadas de 1940 e 1950, com a seleção da cultivar Mundo Novo (em lavoura comercial, como produto de um provável cruzamento natural entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho), e posteriormente, nas décadas de 1950 e 1960, com a obtenção da cultivar Catuai (através da hibridação artificial entre as cultivares Mundo Novo e Caturra Amarelo), verificou-se um salto na cafeicultura brasileira. Com a renovação das lavouras, no final dos anos 60 e início da década de 1970, praticamente todo o parque cafeeiro brasileiro passou a ser constituído por linhagens selecionadas nas cultivares Mundo Novo e Catuai, dando mostras da efetiva aceitação desses materiais pelos cafeicultores.

Apesar de ainda se encontrarem poucas lavouras formadas com cultivares

mais antigas, particularmente Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo, a cafeicultura brasileira é hoje constituída basicamente por linhagens das cultivares Mundo Novo, Catuaí e, mais recentemente, em áreas ainda pouco expressiva, Icatu e Rubi (Mendes, 1998).

2.5.1 Acaíá

A cultivar Acaíá foi selecionada no germoplasma de Mundo Novo, a partir de plantas dessa cultivar que apresentaram sementes de maior tamanho e boa capacidade produtiva. No dialeto guarani, o termo Acaíá significa “frutos com sementes grandes”. Acredita-se que esse fenótipo “sementes grandes” tenha sido herdado da cultivar Sumatra, que participou do cruzamento que originou a Mundo Novo. A seleção foi realizada em cafeeiros descendentes principalmente da planta de prefixo P-474, que originou as progênies atuais de Acaíá.

Apresenta-se com boa produção de café beneficiado e boa rusticidade. A altura média das plantas chega a atingir 4,2 metros (entre 4,1 e 4,4 m) e o diâmetro médio da copa, 1,8 metro (1,6 a 2,0m). A cor da brotação jovem é geralmente bronze e os ramos secundários são menos abundantes que nas seleções de Mundo Novo. Há preferência para plantio, pelos cafeicultores, da seleção LCP-474-19, que tem se mostrado mais vigorosa e mais produtiva que as demais (Mendes, 1998).

2.5.2 Icatu

A cultivar Icatu foi obtida a partir de hibridação interespecífica, realizada entre um cafeeiro tetraploidizado artificialmente cultivar Robusta de

C. canephora com um cafeeiro da cultivar Bourbon Vermelho de *C. arabica*.

O trabalho foi iniciado em 1950, no IAC, em Campinas-SP, com o objetivo de transferir alelos de resistência à ferrugem, da espécie *C. canephora* para a espécie *C. arabica*, embora a doença somente viesse a se tornar problema no Brasil quase 20 anos depois. Cafeciros F₁ (Robusta x Bourbon Vermelho) com 44 cromossomos foram selecionados e retrocruzados com cafeeiros selecionados da cultivar Mundo Novo, sendo o produto resultante avaliado em campo para análise de sua produção. Da mesma forma, outros dois retrocruzamentos foram realizados para Mundo Novo, com o objetivo de recuperar o maior número possível de alelos daquela cultivar e, com isso, manter o fenótipo para caracteres como qualidade de bebida, produção, aspecto vegetativo e outros.

Dada a sua origem, a cultivar Icatu se assemelha muito à Mundo Novo (pelo menos 95% dos alelos presentes em suas progênies são oriundos de Bourbon Vermelho – um dos ancestrais de Mundo Novo e de Mundo Novo – através dos três retrocruzamentos realizados). Por essa razão, de certa forma a cultivar Icatu pode ser considerada como melhoramento da cultivar Mundo Novo, em que a tolerância à ferrugem foi introduzida. O porte da planta é alto (em média ao redor de 3,0 metros), o diâmetro da copa a 1,5m do solo é de 2,2 a 2,4m. O sistema radicular é muito desenvolvido, presumivelmente herdado da cultivar Robusta. A ramificação produtiva secundária é abundante e a coloração das folhas, quando novas, é variável de verde, bronze claro até o bronze escuro. A época de florescimento é normal, semelhante à Mundo Novo, porém a época da maturação dos frutos é bastante variável entre progênies, o que tem possibilitado o escalonamento de colheita em propriedades com mais de uma progênie de Icatu .

Em vários experimentos, tem-se observado que as melhores progênies de Icatu vêm mantendo produtividades médias excepcionais, próximas às obtidas com as melhores seleções de Mundo Novo, mesmo que o controle químico de ferrugem não seja realizado nas seleções de Icatu e controle com fungicidas foliares ou granulados de solo seja aplicado nas seleções de Mundo Novo. Existem evidências de que a cultivar Icatu apresenta variabilidade para resistência aos nematóides e a *Colletotrichum coffeanum*, o que vem sendo pesquisado pelo IAC.

Por apresentar elevado porte de planta, maior diâmetro de copa e vigor vegetativo, não tem sido recomendado o plantio da cultivar Icatu no sistema adensado, pois rapidamente ocorreria o fechamento da lavoura e o manejo com podas seria necessário após poucas colheitas, o que certamente encareceria o sistema de produção. Como opção mais viável, tem-se o renque mecanizável, com espaçamento variável de 3,5 a 4,0m entre linhas e 0,7 a 1,0m entre plantas (Mendes, 1998).

2.5.3 Rubi e Topázio

Para obtenção das cultivares Rubi e Topázio, foram realizados estudos com a cultivar Catuaí, tendo como meta a diversificação de suas características, embora esta cultivar apresente-se muito produtiva. Em algumas condições de plantio e manejo, a cultivar Catuaí pode exibir reduzido vigor vegetativo depois de elevadas produções, caracterizando-se pela seca de ramos produtivos, à semelhança da cultivar Caturra que lhe deu origem. O método empregado no seu melhoramento, que se assemelha ao genealógico, fez com que, ao final, suas progênies apresentassem cerca de 50% dos alelos da cultivar Mundo Novo e 50% da cultivar Caturra Amarelo.

Uma das possibilidades de recuperar alelos de importância da cultivar Mundo Novo, particularmente aqueles associados ao vigor vegetativo, é a aplicação do método de retrocruzamentos nas melhores seleções de Catuaí, cruzando-as por sucessivas gerações com seleções de elevado valor agrônômico da cultivar Mundo Novo. Com esse procedimento, torna-se possível a melhoria da cultivar Catuaí, por aproximação dos 100% dos alelos de Mundo Novo, mantendo da cultivar Caturra o alelo *Ct* na condição homozigota, o que lhe confere o porte baixo e homogêneo.

Foi com o objetivo de diversificar as características da cultivar Catuaí e selecionar formas mais produtivas, mais vigorosas, mais precoces e uniformes quanto à maturação de frutos que se procedeu a obtenção da cultivar Rubi, através de retrocruzamentos de Catuaí com Mundo Novo. Vários materiais foram obtidos, sendo o trabalho inicial realizado pelo IAC, nas décadas de 1960 e 1970. Posteriormente, com a introdução desse material em Minas Gerais pelo sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG-UFLA-UFV), novos retrocruzamentos foram realizados e a seleção intensificada. As avaliações preliminares das populações que deram origem à Rubi evidenciaram o potencial produtivo do material, com produções médias superiores em até 58% a algumas linhagens de Catuaí, numa avaliação de 16 colheitas (Fazuoli et al., 1993).

O material selecionado e lançado em Minas Gerais possui porte baixo como a Catuaí, com altura ao redor de 2,0 metros e diâmetro médio de copa de 1,8m aos sete anos. Tem excelente produtividade e elevado vigor vegetativo, não exibindo depauperamento precoce após elevadas produções. O número de ramificações secundárias é abundante, angulações dos ramos produtivos pouco mais abertas que a Catuaí, o que permite maior aeração e insolação no interior da planta. A maturação de frutos é intermediária entre Catuaí e Mundo Novo em época e uniformidade. Os frutos são de coloração vermelha e as folhas, quando

novas, são predominante de cor bronze escuro, marcador genético que a difere da Catuai (brotos verdes).

Analogamente ao que foi comentado para a cultivar Icatu, pode-se considerar a cultivar Rubi como melhoramento da cultivar Catuai, encontrando-se maior número de alelos da cultivar Mundo Novo, o que confere à cultivar Catuai a melhor expressão dos caracteres considerados. Seria, de certa forma, uma tentativa de se obter a cultivar Mundo Novo, com todas as suas vantagens sobre a Catuai, porém acrescida do porte baixo, o que é desejável.

As seleções de prefixo MG-1190 e MG-1192 têm sido indicadas para plantio em escala comercial. Em média, em experimentos, têm apresentado rendimento de grãos entre 10 e 15% superior às testemunhas de Catuai.

Em razão do porte e arquitetura serem muito semelhantes à cultivar Catuai, as recomendações de espaçamento para plantio, tanto no sistema adensado quanto no livre crescimento (renque mecanizado), são as mesmas para essa cultivar. O que diferencia as cultivares Rubi e Topázio é somente a coloração do fruto, sendo este vermelho no caso da cultivar Rubi e amarelo no caso da cultivar Topázio (Mendes, 1998).

2.5.4 Catuai

A cultivar Catuai foi a primeira a ser selecionada após o emprego de hibridação artificial no melhoramento genético do cafeeiro no Brasil. A cultivar teve origem na hibridação Caturra Amarelo (C-476-11) x Mundo Novo (CP-374-19), que teve como objetivo principal o estudo da herança do porte baixo em algumas cultivares, entre elas a Caturra, com vistas à transferência dessa característica para a Cultivar Mundo Novo.

O cruzamento original, realizado em 1949, no IAC, recebeu o prefixo H-2077. A partir de apenas três plantas obtidas em F₁, foi possível dar prosseguimento aos trabalhos até a obtenção da cultivar Catuai. Aos descendentes desses cafeeiros a partir da geração F₄ e gerações subsequentes, caracterizados por serem vigorosos e muito produtivos, deu-se a denominação de Catuai vermelho e Catuai amarelo, conforme o alelo fixado para cor de fruto (CtCt xxcx: Catuai Amarelo; CtCt XcXc: Catuai Vermelho). O termo Catuai, em guarani, tem o significado “muito bom”.

As linhagens de Catuai, tanto vermelho quanto amarelo, apresentaram-se bem vigorosas, com altura entre 2,0 e 2,4 metros e diâmetro de copa entre 1,7 e 2,1 metros. A principal característica é possuir internódios curtos, o que lhes confere o porte baixo, além de abundante ramificação secundária. As folhas novas são verdes mais claras e as adultas mais escuras e brilhantes; na cultivar Catuai não há brotação nova de coloração bronze.

Comparativamente às progênies de Mundo Novo, as de Catuai têm maturação de frutos mais tardia e mais desuniforme por produzirem vários florescimentos desde o início da primavera, particularmente em condições de altitude mais elevada e clima ameno.

Segundo Matiello et al. (1987), as linhagens de Catuai exibem maior tolerância à ferrugem quando comparadas à cultivar Mundo Novo, sendo ainda menos sensíveis aos efeitos de ventos frios e mais exigentes em boro.

Tem-se observado, em experimentos, que as melhores seleções de Catuai têm a mesma capacidade produtiva das melhores seleções de Mundo Novo e, devido ao porte reduzido, possibilitam o plantio em espaçamentos mais adensados, com maior produtividade (Mendes, 1997).

2.5.5 *Coffea arabica* L. Var. *Caturra*

Esta variedade originou-se na divisa dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, na Serra do Caparaó, provavelmente como mutante da variedade Bourbon.

Sua principal característica é o porte reduzido, bem inferior às variedades Arábica e Bourbon, com internódios mais curtos, folhas maiores e mais largas, bordos ondulados, de coloração verde desde os estágios iniciais de desenvolvimento. Os frutos se assemelham aos da variedade Bourbon.

Apresenta elevada capacidade produtiva nas primeiras colheitas, reduzindo drasticamente esse potencial com o passar dos anos, com acentuada morte de ramos plagiotrópicos e intenso depauperamento de toda a planta. Acredita-se que esse fato seja consequência da baixa capacidade de absorção e acúmulo de nutrientes pelas raízes, já que esta variedade se adapta bem às condições dos solos vulcânicos da Colômbia e da Costa Rica.

Trata-se do primeiro mutante encontrado com porte pequeno e elevada capacidade produtiva, e por esse motivo, muito contribuiu para o programa de melhoramento desenvolvido no IAC, no qual foi, então, concluída a transferência desse porte para outros cultivares comerciais. A característica é controlada por apenas um gene, denominado *caturra* (*Ct*), com dominância do alelo que confere porte baixo sobre o porte alto (*CTCt* e *Ctct* porte baixo; *ctct* porte alto). A distinção das plantas altas e baixas ainda no viveiro, quando se está trabalhando com gerações segregantes para o alelo *Ct*, é um pouco dificultada pela variação nas condições de ambiente em que se desenvolvem as mudas; no campo, contudo, essa distinção é inequívoca logo nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas (Mendes, 1998).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERSON, R.C. Absciscic acid and precocious germination in soybean. *Journal Experimental of Botany*, Oxford, v.35, n.152, p.414-21, Mar. 1984.
- ALFERMANN, A.W.; PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.43, n.2, p.199-205, 1995
- ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedlings. *American Journal of Botany*, Columbus, v.54, n.3, p.291-298, Mar. 1967.
- BALAGA, H.Y.; DE GUZMAN, E.V. The growth and development of coconut "Makapuno"embryos "in vitro". Increased root incidence and growth in response to media composition and to sequencial culture from liquid to solid medium. *Philippinnes Agriculture*, Laguna, v.53, p.551-565, 1972.
- BANDEL, G.; CARVALHO, F.J.P.C.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; GUTIERREZ, L.E.; CARVALHO, P.C.T. Aspectos citológicos da diferenciação de tecidos de cafeeiros cultivados "in vitro". *Anais da "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.32, p.717-724, 1975.
- BERTHOULY, M.; ECHEVERI, J.H. Multiplicacion asexual de diferentes lineas de Catimor: inducion "in vitro" de yemas axilares latentes. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE TECNOLOGÍA CAFEEIRA, 1987, Campinas. Resumos... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1987. v.1, p.279-283.
- BEWLEY, J.D.; BLACK. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Berlin: Springer Verlag, 1982. v.2, 375p.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-70.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO J.A. (eds). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.87-132.
- CARVALHO, F.J.P.C.; CARVALHO, P.C.T.; CROCOMO, O.J. Cultura de tecidos de explantes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 1974, Poços de Caldas. Resumos... Rio de Janeiro, 1974. v.2, p.299-300.
- COLONNA, J.P. Contribution a l'étude de la culture "in vitro" d'embryos de cafeiers. Action de la cafeine. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v.16, n.3, p.193-203, jul./sept. 1972.
- CUSTER, J.B.M.; VAN, E.G.; BUIJS, L.C.; Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: INTERNATIONAL SCIENCE COLLOQUIUM ON COFFEE, 9., 1980, London. Paris: Asic, 1980. p.586-96.
- DE PENA, M. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *C. arabica*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEEIRO, 1983, Oeiras, Portugal. Proceedings... Oeiras, Portugal: CIFC, 1983. p.493-512.
- DUBLIN, P. Embryogenesis somatique directe sur fragments de feuilles de cafeier Arabusta. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v.25, n.4, p.237-241, oct./dec. 1981.
- DUBLIN, P. Multiplication vegetative "in vitro" de l'arabusta. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v.24, n.4, p.281-290, oct./dec. 1980.
- FISHER, J.B.; TSAI, J.H. *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm. *In Vitro*, Columbia, v.14, p. 307-311, 1978.
- FRANÇA. S.C. Abordagens biotecnologicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. (eds). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121

- GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.) **Plant propagation by tissue culture: part 1- The technology**. 2.ed. Somerset: England: Exegetics, 1993. cap.2, p.37-66.
- GUEVARA, E.B. Reguladores de crescimento. In: **CURSO DE CULTIVO DE TEJIDOS**, 2., Turrialba, Costa Rica, 1987. p.58-79.
- HERMAN, E.B.; HASS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **Hort Science**, Alexandria, v. 10, n.6, p.588-589, Dec. 1975.
- INNECO, R. Propagação vegetativa de pimentão (*Capsicum annum* L.) através de métodos *in vitro* e estacas. Lavras: UFLA, 1993. 105p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- KRASNYANSKI, S.; POLGÁR, Z.; NÉMETH, G.; MENEZEL, L. Plant regeneration for callus and protoplast of *Heliantus giganteus* L. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, n.1, p.7-10, Dec. 1992.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, n.30, p.421-427, 1980.
- LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In vitro Cell Development Biology**, Columbia, v.92, p.92-96, Apr. 1993.
- MATIELLO, J.B.; SANTINATO, R.; CAMARGO, A P. de et al. **A moderna cafeicultura dos cerrados: instruções técnicas sobre a cultura de café no Brasil**. Rio de Janeiro: SEPRO/COTEC/DIPRO/IBC, 1987. 148p.
- MELO, B. de; BARTHOLO, G.F.; MENDES, A.N.G. Café: variedades e cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.193, p.92-96, 1998.
- MENDES, A.N.G. Economia cafeeira: o agribusiness. In: MENDES, A.N.G.; RUBENS, J.G. (eds) **Cafeicultura empresarial - produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v.1, p.1-59.
- MENDES, A.N.G. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: MENDES, A.N.G.; RUBENS, J.G. (eds) **Cafeicultura empresarial - produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. v.1, p.1-98.

- 
- MONACO, L.C.; SONDAH, M.R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, A.J.; SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of Coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (eds). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-129.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T.A. (ed.). **Frontiers of plant tissue culture**. Calgary, Canada: International Association for Plant Tissue Culture, 1978. p.277-295.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, June 1962.
- OWUOR, J.B.O. *In vitro* initiation of arabusta coffee hybrids. **Kenya Coffee**, Nairobi, n.1, p.59-62, mar.1987.
- PIERSON, E.S.; VAN LAMMERN; SCHEL, J.H.; STARITSKY, G. In vitro development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Vienne, v.115, n.2/3, p.208-216, 1983.
- RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. New York: Academic Press, 1976. 376p.
- RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of Coffee. **Journal of Research**, v.19, n.2, p.71-81, 1989.
- SCRAGG, A.H. Secondary products from cultured cells and organs: II. Large scale culture. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (eds). **Plant cell culture: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. (The Practical Approach Series)
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.R. Coffee. In: AMMYRATO MCMILLEN, (eds). **Handbook of plant cell culture**. New York, 1984. p.564-590.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation in vitro Del café. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. (eds). **Cultivo de tejidos em la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba, 1991. p.621-642.

- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultura leaf explant of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, Zurik, v.81, n.4, p.395-408, 1977.
- SREENATH, H.L. Biotechnology for genetic improvement of Indian coffee. In: **INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY**, 3., 1999, Londrina. **Proceedings...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p.247-250.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissue of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.19, n.4, p.509-514, Aug. 1970.
- THORPE, A.T.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, J.K. (ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plant**. Orlando: Thorpe & Patel, 1984. p.49-60.
- VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal Experimental of Botany**, Oxford, v.27, n.100, p.983-999, Oct./Nov. 1976.
- WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: Pensylvania, Costel e Company, 1943. 273p.
- ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayretia japonica*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Doordrecht, v.36, p.73-79, 1994.
- ZOK, S.; DUBLIN, P. Multiplication végétative *in vitro* par cultura d'apex chez *Coffea arabica* L.: action de solutions minerales et de regulateurs de croissance. **Café, Caçã, Thé**, Paris, v.14, n.4, p.275-302, oct./dec. 1991.

CAPITULO 2

RIBEIRO, Lilian de Sousa. *Cultura de embriões de Coffea arabica L.* Lavras: UFLA, 2001. 25 p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)*

1 RESUMO

A composição do meio de cultura é de grande importância para o desenvolvimento do embrião *in vitro*, sendo necessário determinar as concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura. Buscou-se determinar as melhores concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 em meio MS para cultura de embriões *in vitro* de *Coffea arabica L.* cultivar Acaiá Cerrado e estudaram-se também os melhores meios de cultura para desenvolvimento de embriões de *C. arabica L.* das cultivares Acaiá, Icatu, Rubi e Topázio. Frutos de *C. arabica L.* no estágio "verde cana" foram utilizados para a extração dos embriões. Os meios nutritivos básicos tiveram o pH ajustado para 5,8 e solidificados com ágar, na proporção de 6 g.L^{-1} . Foram testadas algumas combinações entre as dosagens estabelecidas de NH_4NO_3 (0, 25, 50, 75 e 100%) e KNO_3 (0, 25, 50, 75 e 100%) do meio MS no experimento 1, e no experimento 2 os tratamentos constituíram-se de quatro tipos de meio de cultura, sendo os meios básicos MS, Knudson, White e WPM, com a inoculação de embriões de quatro cultivares diferentes de *C. arabica L.* Para as condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir, no experimento 1, que na cultura de embriões de *C. arabica L.* a concentração de Nitrato de Amônio do meio MS pode ser reduzida em até 50%. A utilização de Nitrato de Potássio resultou num melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular quando comparado ao meio sem KNO_3 . No experimento 2, embriões das cultivares Rubi e Acaiá se desenvolvem melhor quando colocados nos meios básicos de cultura MS, seguidos do meio Knudson.

*Comitê Orientador: Moacir Pasqual - UFLA (Orientador), Antônio Nazareno Guimarães Mendes - UFLA

2 ABSTRACT

RIBEIRO, Lillian de Sousa.. *Coffea arabica* L. embryos culture. Lavras: UFLA, 2001. 25 p. (Dissertation - Master Program in Agronomy/Crop Science)*

The culture medium composition is very important for the *in vitro* embryo development, being necessary to determine the optimal culture medium components concentrations. It was aimed to determine the best doses of NH_4NO_3 and KNO_3 in MS medium for *in vitro* culture of *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado embryos; the best culture medium for four *Coffea arabica* L. cultivars embryos development. For the embryos extraction, *C. arabica* fruits in the "light green" stage were used. The basic nutritive medium had the pH adjusted for 5,8 and was solidified with 6 g.L^{-1} agar. All the possible combinations were tested among the NH_4NO_3 (0, 25, 50, 75 and 100%) and KNO_3 (0, 25, 50, 75 and 100%) doses of the MS medium in the experiment 1, and in the experiment 2 the treatments were four types of culture media: MS, Knudson, White and WPM, with the embryos inoculation of four different *C. arabica* cultivars, Topázio, Rubi, Acaiá and Icatú. For the conditions in which the experiments were carried out, it can be concluded for the experiment 1 that in the culture of *Coffea arabica* embryos, the Ammonium Nitrate concentration in the MS medium can be reduced up to 50%. The use of Potassium Nitrate resulted in a better development of aerial part and root system when compared to the media without KNO_3 . In the experiment 2, the best development of the embryos were found for Rubi and Acaiá cultivars, when placed in the MS and Knudson media. In some parameters cv Acaiá developed better than cv Rubi.

*Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Antônio Nazareno Guimarães Mendes - UFLA

3 INTRODUÇÃO

Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos oferecem aos melhoristas de plantas uma oportunidade para aumentar a variabilidade genética e para transferir genes desejáveis entre espécies, principalmente das silvestres para as cultivadas (Gomathinayagam et al., 1999). Em tais cruzamentos podem ocorrer barreiras tanto pré como pós-fertilização, resultando em sementes chochas e embriões abortivos. O uso de hibridação entre espécies diferentes é principalmente limitado por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com degeneração dos embriões antes que atinjam a maturidade (Mallikarjuna, 1999; Sukno et al., 1999; Angra et al., 1999). Algumas vezes, embriões híbridos podem ser salvos se forem removidos antes que ocorra o aborto e cultivados artificialmente em um meio nutritivo (Asano e Imagawa, 1999). Melhoristas de frutíferas têm tido sucesso no resgate de embriões e posterior obtenção de plantas a partir de frutos sem sementes de videira (Emershad, Ramming e Serpe, 1989; Gribaudo et al., 1993; Gomathinayagam et al., 1999).

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado sob condições assépticas em meio de cultura adequado, mantendo-se geneticamente estável, produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfestar apenas a superfície externa da semente, devido ao fato de que o embrião está alojado em região estéril da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* é muito baixo em relação às demais culturas (Illg, 1986).

A cultura de embriões possibilita recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, micropropagação, superação de dormência e esterilidade de sementes (Hu e Ferreira, 1988), além do estudo detalhado dos problemas nutricionais e fisiológicos do embrião, permitindo a multiplicação de plantas

selecionadas com o objetivo de antecipar a época de plantio em culturas como a do cafeeiro.

Os meios de cultura, por consistirem parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes. Um grande passo foi dado em 1962, com a publicação de um trabalho por Murashige e Skoog (1962), que determinaram a concentração de sais, estabelecendo o tão conhecido meio 'MS'. Usa-se também o meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Lloyd e McCown (1980), o meio básico Knudson (modificado por Ardite, 1967) e o meio básico White (1943), entre outros.

★ O nitrogênio é um dos elementos essenciais e ativos para diversos processos metabólicos da planta, pois é constituinte de várias biomoléculas essenciais, tais como: aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas, enzimas e outros. Além disso, depois da sacarose, os minerais constituem o grupo mais importante de nutrientes para o desenvolvimento *in vitro*. Há uma larga escolha de combinações de macro e microelementos e esta é fortemente dependente da espécie de planta a ser micropropagada (Pierik, 1987). Segundo Murashige e Skoog (1962), mesmo os tecidos originários de diferentes partes de uma planta podem possuir diferentes requerimentos para um desenvolvimento satisfatório, como tal, nunca um único meio pode ser recomendado como inteiramente satisfatório para todos os tipos de tecidos e órgãos. O nitrogênio é o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do potencial osmótico do meio.

A alta concentração de sais do meio MS, comparada a outros meios, especificamente dos níveis de amônio ($-NH_4$) e nitrato ($-NO_3$), pode ser crítica no processo de morfogênese e crescimento (Sakuta e Komamine, 1987), estando, pois, a demanda energética fornecida pelo metabolismo de carboidratos

e a assimilação desses íons diretamente relacionada com o sucesso da cultura *in vitro* (Magalhães e Wilcox, 1987; Sakuta e Komamine, 1987).

O cafeeiro, como outras culturas, libera substâncias fenólicas e, por esta razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias anti-oxidantes, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico.

Neste trabalho, buscou-se determinar: 1) as melhores doses de NH_4NO_3 e KNO_3 em meio MS para cultura de embriões *in vitro* de *C. arabica* cv. Acaia Cerrado; e 2) os melhores meios de cultura para desenvolvimento de embriões de quatro cultivares de *C. arabica*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *C. arabica* no estágio "verde cana" foram utilizados para a extração dos embriões no estágio torpedo.

Os meios nutritivos básicos tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, foram acrescidos de 1g.L^{-1} de carvão ativado e 300 mg.L^{-1} de ácido ascórbico e solidificados com ágar, na proporção de 6g.L^{-1} .

Após o preparo, foram distribuídos cerca de 15 mL de meio por tubo de ensaio (25 x 150 mm) e 30 mL de meio quando foram utilizadas placas de petri. Os tubos foram vedados com tampa de polipropileno e filme de PVC para evitar contaminação. Os meios foram esterilizados utilizando autoclave à temperatura de $121\text{ }^\circ\text{C}$ e 1,2 atm de pressão, durante 20 minutos.

Os embriões foram inoculados assepticamente em câmaras de fluxo laminar horizontal. Após o processo de inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura de $26\text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas luz e

intensidade luminosa de $35 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, suprida por lâmpadas grow-lux e branca-fria, na proporção de 1:1, permanecendo nestas condições por um período de 60 dias.

Foram avaliadas as variáveis comprimento da parte aérea (mm), comprimento de raiz (mm), peso da matéria fresca do sistema radicular e parte aérea (g).

Preparação dos Embriões

Os embriões foram extraídos de sementes de *C.arabica.*, oriundas de frutos em estágio "verde cana". Após a colheita, os frutos foram tratados com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio puro por 15 minutos e lavados por 3 vezes consecutivas com água esterilizada, dentro da câmara de fluxo laminar. Os embriões no estágio torpedo foram extraídos sobre placas de petri contendo 600 mg.L^{-1} ácido ascórbico para evitar a oxidação dos mesmos. Em seguida foram inoculados no meio de cultura, colocando-se um embrião por tubo de ensaio, correspondente à parcela experimental.

Experimento 1: Desenvolvimento de Embriões de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado inoculados em meio MS com variação nas fontes de Nitrogênio (Nitrato de Amônio - NH_4NO_3 e Nitrato de Potássio - KNO_3).

Foram testadas todas as combinações dentro das estabelecidas entre as dosagens de NH_4NO_3 (0, 25, 50, 75 e 100%) e KNO_3 (0, 25, 50, 75 e 100%) do meio MS. O experimento foi conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras

(UFLA). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), no esquema fatorial de 5x5, com 4 repetições.

Os embriões foram inoculados em placas de petri (tendo em média 15 embriões por placa), contendo o meio básico MS acrescido de 1g.L^{-1} de carvão ativado e 300 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, pH ajustado para 5,8 e solidificados com ágar na proporção de 6 g.L^{-1} , em que permaneceram por 15 dias para germinação. Logo após este período, os embriões foram passados assepticamente para os tubos de ensaio (um embrião por tubo) nos quais receberam os tratamentos.

Experimento 2: Influência dos Meios de Cultura (MS, Knudson, WPM e White) no desenvolvimento de embriões de *C. arabica* cvs. Rubi, Acaiá, Topázio e Icatu.

Os tratamentos constituíram-se de quatro tipos de meio de cultura (MS, Knudson, White e WPM - Tabela 1), com a inoculação de embriões de quatro cultivares diferentes de *C. arabica* (Topázio MG 1190, Rubi MG 1192, Acaiá Cerrado MG 1474 e Icatu Vermelho 2842). Os frutos foram tratados com álcool 70% por 1 minuto; logo após foram colocados em hipoclorito de sódio puro por 15 minutos, e a seguir foram feitas três lavagens com água destilada autoclavada, dentro da câmara de fluxo laminar. Utilizaram-se 600 mg de ácido ascórbico/litro de água para diminuir a oxidação dos embriões. Os embriões foram retirados em câmaras de fluxo laminar, em condições assépticas, e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo, em média, 15 mL de meio de cultura. Cada tubo conteve um único embrião. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições e três tubos por repetição, e para o teste de médias observadas utilizou-se o teste de Scott-Knott (1974).

Tabela 1. - Componentes (em mg.L⁻¹) dos principais meios básicos de cultura (Caldas et al., 1998).

Componentes	MS	White	WPM	Knudson
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	-	96	-
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	300	556	1000
KCl	-	65	-	-
KH ₂ PO ₄	170	-	170	250
KNO ₃	1900	80	-	-
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	720	370	250
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-	19	-	-
Na ₂ SO ₄	-	200	-	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	400	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	500
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	-	-	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.001	0.25	0.040
Fe(SO ₄) ₃	-	205	-	-
H ₃ BO ₃	6.2	1.5	6.2	0.056
KI	0.83	0.75	-	-
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	7	22.3	0.0075
MoO ₃	-	0.0001	-	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	-	0.25	0.016
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	3	8.6	0.331
Fe(SO ₄) 7H ₂ O	27.8	-	27.8	0.025
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.2	-	37.2	-
Ácido Nicotínico	0.5	0.5	0.5	-
Glicina	2.0	3.0	-	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Piridoxina.HCl	0.5	0.1	0.5	-
Tiamina.HCl	0.5	0.1	1.0	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	30	30	20	20
Carvão	-	-	-	2

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Desenvolvimento de Embriões de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado inoculados em meio MS com variação nas fontes de Nitrogênio (Nitrato de Amônio - NH_4NO_3 e Nitrato de Potássio - KNO_3).

O resumo das análises de variância para as características avaliadas é representado na Tabela 2, mostrando que a interação foi significativa ao nível de 5 % de probabilidade para todas as variáveis, sendo que, para PMFPA, não houve efeito significativo.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para as características comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), peso da matéria fresca do sistema radicular (PMSFR), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	Quadrado		Médio		
	G. L.	CPA	CR	PMSFR	PMFPA
NH_4NO_3	4	14,826657**	96,555975**	0,000010	0,000868 ^{NS}
KNO_3	4	10,335671**	67,634799*	0,000016*	0,001012 ^{NS}
$\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$	16	3,826861*	42,746153*	0,000008*	0,000522 ^{NS}
Erro	75	1,893602	22,746153	0,000004	0,000490 ^{NS}
CV (%)		13,98	38,27	47,44	89,83

*, **, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade

Na Tabela 3, pode-se observar no desdobramento da interação, as concentrações significativas de KNO_3 para cada uma das variáveis, com os respectivos pontos de máxima para NH_4NO_3 . Observam-se também as quantidades de nitrogênio sob a forma de nitrato e amônio para as duas fontes usadas. Estes valores foram calculados em milimolar (mM) individualmente,

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos no desenvolvimento de embriões de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado inoculados em meio MS com variação nas fontes de Nitrogênio (Nitrato de Amônio - NH_4NO_3 e Nitrato de Potássio - KNO_3). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Características avaliadas	Tratamentos		KNO_3 (mM)	NH_4NO_3 (mM)		Total (mM)		Relação	Comprimento e Peso
	KNO_3 (%)	NH_4NO_3 (%)	NO_3	NH_4	NO_3	NH_4	NO_3	NO_3/NH_4	
Comprimento da parte aérea (mm)	0	59,06	0	12,18	12,18	12,18	12,18	1 : 1	10,6
	50	54,89	9,40	11,32	11,32	11,32	20,72	1,83 : 1	11,24
Comprimento do sistema radicular (mm)	0	61,30	0	12,64	12,64	12,64	12,64	1 : 1	13,68
	100	50,14	18,81	10,34	10,34	10,34	29,15	2,82 : 1	16,78
Peso da matéria fresca do sistema radicular (g)	0	73,50	0	15,16	15,16	15,16	15,16	1 : 1	0,0057
	100	73,00	18,81	15,05	15,05	15,05	33,86	2,25 : 1	0,0081

totalizando o nitrogênio disponível no meio de cultura. A relação Nitrato/Amônio, como também os valores observados para as características avaliadas, estão registrados na referida tabela.

Comprimento da parte aérea

Comparando as curvas, observa-se que, na ausência de KNO_3 no meio de cultura, observou-se uma maior utilização do nitrogênio na forma de nitrato de amônio, por ser esta a única fonte de nitrogênio disponível no meio. A relação NO_3/NH_4 para esta variável foi de 1:1 (Tabela 3). A ausência de KNO_3 resultou num crescimento no comprimento da parte aérea até o nível de 59,06% de Nitrato de Amônio (Tabela 3), registrando-se redução no crescimento em concentrações mais elevadas neste tratamento (Figura 1).

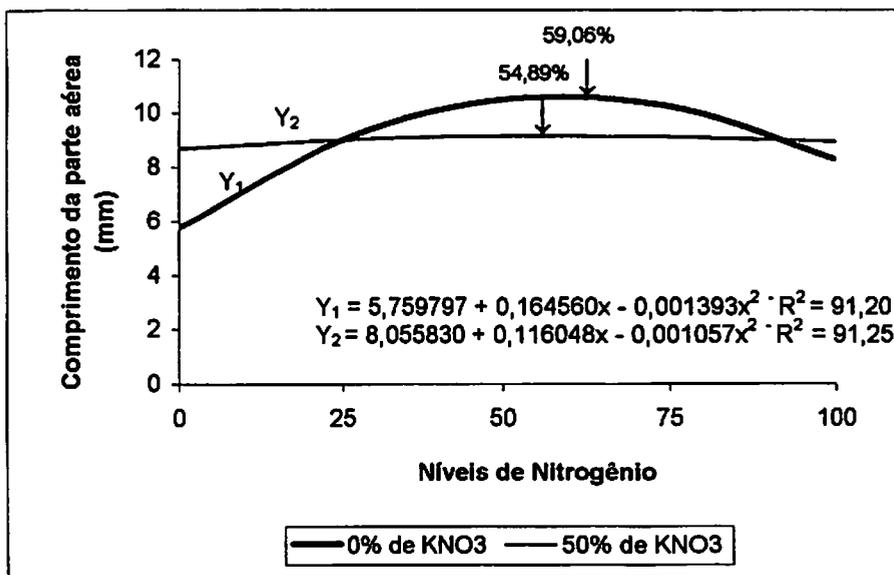


FIGURA 1. Comprimento da parte aérea de embriões de *C. arabica* cv Acaia inoculados em meio básico MS com diversas concentrações de NH_4NO_3 , na ausência e presença de 50% de KNO_3 . UFLA, Lavras-MG, 2001.

Em compensação, pode-se observar que para a dosagem de 50% de KNO_3 , houve uma redução na absorção no nitrogênio proveniente do nitrato de amônio (54,89%, Tabela 3). Com o aumento de uma fonte de nitrogênio, a relação NO_3/NH_4 passou para 1,83. Com a utilização de 50% de KNO_3 , acréscimos foram visíveis no desenvolvimento da parte aérea, passando de 10,6 para 11,24 mm. Doses superiores a 59,06 e 54,89% de NH_4NO_3 (Figura 1) promoveram menor comprimento da parte aérea.

Comparando as duas curvas, pode-se notar que KNO_3 na concentração de 50 %, associado a 54,89 % de NH_4NO_3 , forma a melhor combinação destas duas fontes de Nitrogênio para a característica crescimento da parte aérea.

Comprimento do sistema radicular

Analisando as curvas de regressão para esta característica, observa-se, na Figura 2, que a não utilização de KNO_3 no meio MS, juntamente com a utilização de 61,30% de NH_4NO_3 , seguiram a mesma tendência da variável anterior, a assimilação de nitrogênio ocorreu somente na forma de nitrato de amônio, tendo a proporção entre os dois sais do meio MS sendo 1:1 (NO_3/NH_4), e como consequência ocorrendo um menor comprimento do sistema radicular (13,68 mm).

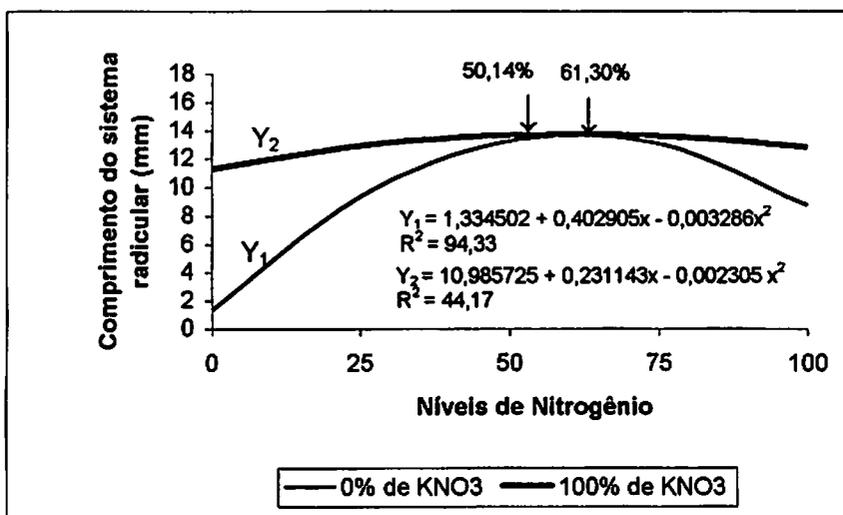


FIGURA 2. Comprimento do sistema radicular de embriões de *C. arabica* cv Acaia inoculados em meio básico MS com diversas concentrações de NH_4NO_3 , na ausência e presença de 100% de KNO_3 . UFLA, Lavras-MG, 2001.

A utilização da dose padrão (1900 mg/L) de KNO_3 para esta característica proporcionou crescimento no comprimento do sistema radicular. Nota-se um acréscimo acentuado no comprimento de raízes (16,78 mm) e o decréscimo da concentração de NH_4NO_3 até o nível de 50,14 %; a relação NO_3/NH_4 para este nível foi de 2,82. As dosagens maiores que 50,14 e 61,30% de NH_4NO_3 promoveram um menor desenvolvimento do sistema radicular (Tabela 3).

Peso da matéria fresca do sistema radicular

Na ausência de KNO_3 , registra-se decréscimo no peso da matéria fresca do sistema radicular à medida que a concentração de NH_4NO_3 no meio MS foi elevada, atingindo o máximo de 73,50 % (0,0057 g) (Figura 3). Dosagens

superiores a esta promoveram a queda no peso do sistema radicular. As curvas de regressão evidenciaram o efeito das concentrações do NH_4NO_3 quando se usaram 100 % de KNO_3 , dose padrão do meio MS. Houve uma pequena redução na absorção de NH_4NO_3 (73,00 %), porém o peso máximo da matéria fresca do sistema radicular também foi obtido com 73 % de NH_4NO_3 ; aumentando este valor para 0,0081 g, a relação NO_3/NH_4 foi de 2,25. O nitrato de potássio teve influência significativa nas variáveis analisadas.

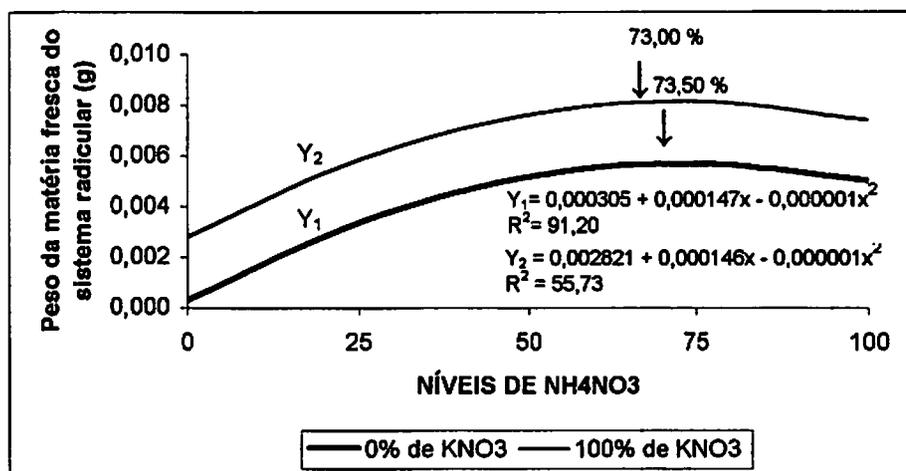


FIGURA 3. Peso da matéria fresca do sistema radicular de embriões de *C. arabica* cv. Acaiá inoculados em meio básico MS com diversas concentrações de NH_4NO_3 , na ausência e presença de 100% de KNO_3 . UFPA, Lavras-MG, 2001.

Vários são os fatores que afetam a cultura de embriões *in vitro*, tais como a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e a própria remoção inadequada do embrião.

O meio de cultura adequado, tanto para propagação quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Estudos envolvendo meios de cultura para embriões usaram amplamente a solução de Snop (Andreoli, 1986).

Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais frequentemente utilizado é o MS (Murashige e Skoog, 1962).

De acordo com George e Sherrington (1984), o desenvolvimento e morfogênese em cultura de tecidos são acentuadamente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido. Apesar do nitrogênio ser, algumas vezes, parcialmente provido em forma orgânica, é usual suprir N em forma de íons NH_4^+ e NO_3^- . O total de N requerido é de 168 a 840 mg.L^{-1} , e a quantidade de NH_4^+ varia de 108 a 360 e NO_3^- de 372 a 2480 mg.L^{-1} . A maioria das plantas priorizam a absorção de NH_4^+ a NO_3^- , apesar de existirem exceções. É necessário encontrar o balanço ideal de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ para o ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro* (George e Sherrington, 1984).

Normalmente o meio de cultura não é tamponado, e a adoção de concentrações de íons de amônio e nitrato tem, portanto, sido mais adequada para o controle de pH que para o requerimento do tecido vegetal para uma outra forma de nitrogênio. Absorção de nitrato requer um pH ácido, mas torna o meio mais básico; ao contrário, a absorção de amônio torna o meio mais básico pela excreção de H^+ . Com o abaixamento do pH, a absorção de amônio é inibida. Portanto, em meios que não são tamponados, a absorção eficiente de nitrogênio pode depender da presença de ambos os íons (George e Sherrington, 1984).

Plantas podem se desenvolver em soluções contendo nitrogênio somente na forma de nitrato, tanto que pesquisadores chegaram a assumir que íons de amônio eram desnecessários (George e Sherrington, 1984). Meios, tais como o Gautheret (1942) e White (1943), possuíam unicamente nitrato. Entretanto, quando nitrato é a única fonte de nitrogênio, nitrito pode ser acumulado no meio e tornar-se tóxico, pela baixa atividade da enzima redutase de nitrito (Jordan e Fletcher, 1979).

De acordo com Meyer e Abel (1975), o ion NH_4^+ influencia na divisão celular. Segundo alguns autores, o fator que determina a formação de parede celular somente é efetivo quando NH_4^+ está presente no meio.

Sargent e King (1974), citados por George e Sherrington (1984), determinaram que células de soja são dependentes de citocinina quando cultivadas em meio contendo nitrogênio na forma NO_3^- , mas independentes de citocina quando NH_4^+ estava presente no meio.

Também Evans, Sharp e Paddock (1976) observaram um bom desenvolvimento de calos de soja quando a concentração molar de NH_4^+ foi reduzida para aproximadamente um terço. Por outro lado, Uesato (1973), Ichihashi e Yamashita (1977) e Ichihashi (1979), citados por George e Sherrington (1984), enfatizam a importância de íons de amônio para o desenvolvimento de plântulas de orquídea.

Níveis de nitrato têm mostrado estreita relação com enraizamento. Segundo Hyndman, Hasegawa e Bressan (1982), nitrato influenciou positivamente o enraizamento de brotos da roseira. Com a ausência da solução NH_4NO_3 no meio de cultura, a fonte de nitrogênio inorgânico dos explantes foi KNO_3 . A presença de íons nitrato pode ter beneficiado, então, o enraizamento de *Heliconia* sp.

A alta concentração de sais do meio MS, comparada a outros meios, especificamente dos níveis de amônio ($-\text{NH}_4$) e nitrato ($-\text{NO}_3$), pode ser crítica no processo de morfogênese e crescimento (Sakuta e Komamine, 1987), estando, pois, a demanda energética fornecida pelo metabolismo de carboidratos e a assimilação desses íons diretamente relacionadas ao sucesso da cultura *in vitro* (Magalhães e Wilcox, 1987; Sakuta e Komamine, 1987).

Experimento 2: Influência dos Meios de Cultura (MS, Knudson, WPM e White) no desenvolvimento de Embriões de *C. arabica* cvs. Rubi, Acaia, Topázio e Icatu.

O resumo da análise de variância é apresentado na Tabela 4. Observa-se que tanto para meios de cultura como para cultivares e a interação entre ambos, para todas as características avaliadas, houve interação significativa ao nível de 1% de probabilidade, através do teste F.

TABELA 4. Resumo das análises de variância para as características comprimento da parte aérea (CPA), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), peso da matéria fresca do sistema radicular (PMFSR) e peso da matéria seca total (PMST). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	G.L	Quadrados Médios			
		CPA	PMFPA	PMFSR	PMST
Meio	3	0,683275**	0,047781**	0,005580**	0,002270**
Cultivar	3	1,316813**	0,028173**	0,003373**	0,001162**
Meio x Cultivar	9	0,115262**	0,002123**	0,000334**	0,000084**
Erro	48	0,023403	0,000578	0,000100	0,000030
CV(%)		10,77	25,59	35,48	29,65

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

Comprimento da parte aérea

O comprimento da parte aérea das plantas variou significativamente em função dos meios básicos de cultura e das cultivares utilizadas. O melhor

resultado foi observado quando se utilizou o meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962) e a cultivar Acaia, como pode ser observado na Figura 4. Embriões de 'Acaia' e 'Rubi' mostraram maior comprimento da parte aérea quando cultivados em meio MS. Por outro lado, as cultivares Icatu e Topázio apresentaram maior crescimento da parte aérea quando se utilizaram o meio MS e Knudson. Esta diferença de comportamento entre as cultivares provavelmente está relacionada a fatores genéticos e ao meio de cultura no que diz respeito a elementos nutricionais nele existentes.

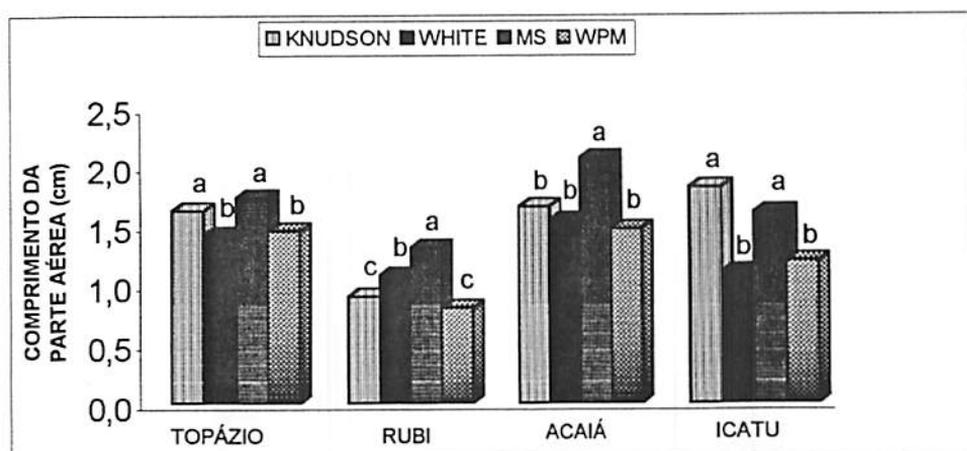


FIGURA 4. Comprimento da parte aérea de embriões de cultivares de *C. arabica* inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da matéria fresca do sistema radicular

A influência dos meios de cultura no peso da matéria fresca do sistema radicular variou entre as cultivares, como pode ser observado na Figura 5. A cultivar Acaiá teve maior peso da matéria fresca do sistema radicular quando se utilizou o meio MS. Enquanto que, nas demais cultivares, os meios MS e Knudson tiveram plantas com maior peso da matéria fresca do sistema radicular, quando comparados com os demais meios.

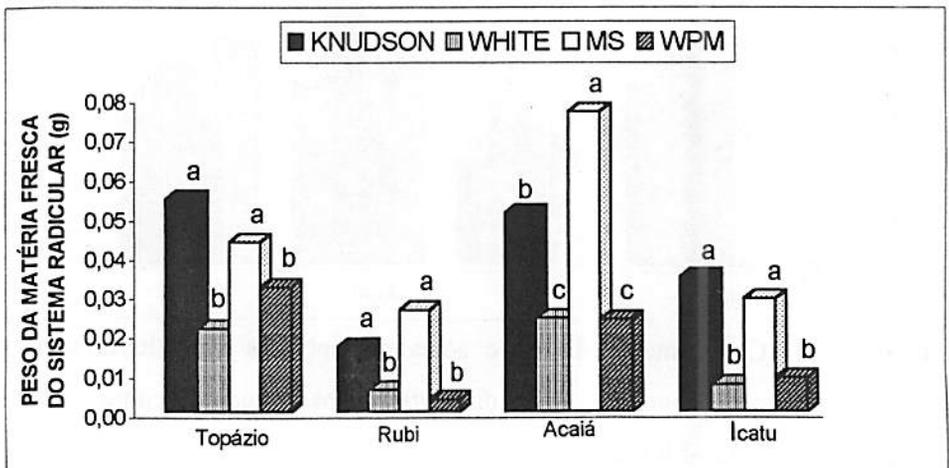


FIGURA 5. Peso da matéria fresca do sistema radicular de embriões de cultivares de *C. arabica* inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da matéria fresca da parte aérea.

O resultado obtido para a variável peso da matéria fresca da parte aérea (Figura 6) seguiu a mesma tendência para o meio MS (Figura 5), destacando-se as cultivares Acaiá e Topázio, com seus embriões inoculados nos meios básicos de cultura MS e Knudson, respectivamente. Em ambos, a presença da interação mostra que a performance das cultivares variou dependendo do meio nutritivo em que os embriões foram inoculados.

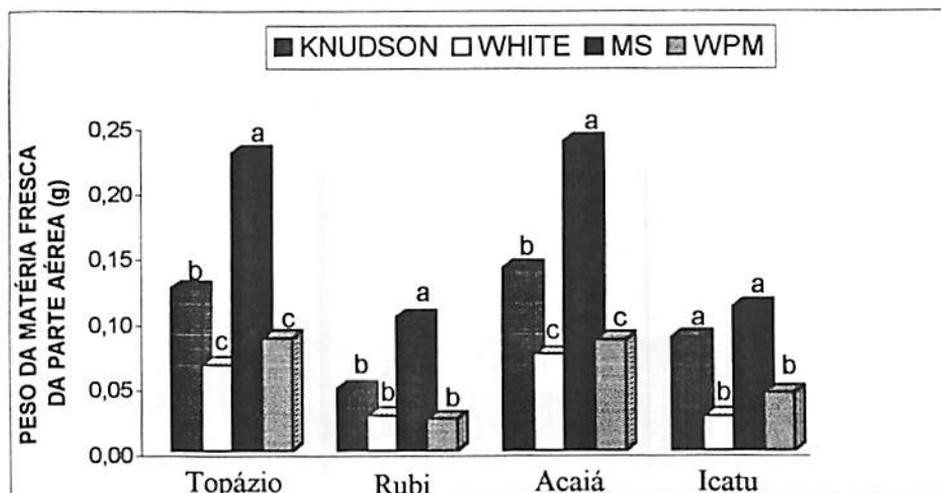


FIGURA 6. Peso da matéria fresca da parte aérea de embriões de cultivares de *C. arabica* inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da matéria seca total

A influência dos meios básicos de cultura para a variável peso da matéria seca, para cada cultivar, é observada na Figura 7. O meio básico de cultura MS promoveu melhor resultado, mantendo a tendência das características anteriores.

Esta diferença de comportamento entre as cultivares pode estar relacionada a fatores genéticos, e as diferenças no comportamento dos meios básicos de cultura apresentaram um efeito significativo quando estes são comparados entre si.

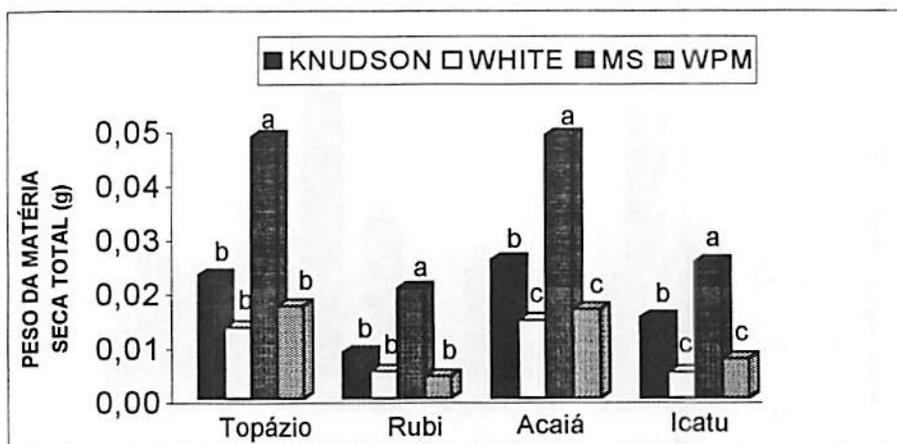


FIGURA 7. Peso da matéria seca total de embriões de cultivares de *C.arabica* inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

O meio de cultura adequado, tanto para propagação quanto para a cultura de embriões, deve ser adequado para cada espécie. Trabalhando com tabaco, Murashige e Skoog (1962) determinaram um meio complexo e rico em nutrientes. Este meio possibilitou um desenvolvimento das culturas cinco a sete vezes mais ativo que outros utilizados.

Os primeiros estudos envolvendo meio de cultura para embriões usaram amplamente a solução de Snop (Andreoli, 1986). Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais freqüentemente utilizado é o MS, embora outros meios possam mostrar grandes eficiências.

Outras causas nas diferenças de comportamento dos cultivares devem estar ligadas a fatores genéticos, conforme afirmam Haissig e Reimenschneider (1988).

6 CONCLUSÕES

Para as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

Na cultura de embriões de *C. arabica*, a concentração de Nitrato de Amônio do meio MS pode ser reduzida em até 50%. A utilização de Nitrato de Potássio na concentração de 50 e 100% resulta num melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, quando comparado ao meio sem adição de KNO_3 .

O meio de cultura MS, de modo geral, foi o melhor para o desenvolvimento de embriões de *C. arabica*. Para as cultivares Rubi e Acaiá, pode-se também optar pelo uso do meio básico de cultura Knudson.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais... Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p.25-28.
- ANGRA, D.C.; BARBOSA, M.M.; PRESTES, A.M.; FERNANDES, M.I.B.D. Embryo culture of backcrosses between hybrids of *Triticum aestivum* Thell. and *Agropyron elongatum* Host. & Beauv. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v, 34, n. 2, p. 209-215, 1999
- ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedlings. American Journal of Botany, Columbus, n.54, p. 291-298, 1967.
- ASANO, Y.; IMAGAWA, M. Hybrid seed formation among *Dioscorea opposita* Thunb. Cvs Nagaimo, Ichaimo, Tsukuneimo and *Dioscorea japonica* Thunb. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, Tokio, v. 68, n. 3, p. 591-597, 1999
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. (eds.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p.87-132.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. Applied regression analysis. 2.ed. New York: John Wiley and Sons, 1981. 709p.
- EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. In ovulo embryo development and plant formation from stenospemnocarpic genotypes of *Vitis vinifera*. American Journal of Botany, Columbus, v.76, n.4, p.397-402, Apr. 1989.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Tissue culture media: Plant propagation by tissue culture. Eastern Press, 1984. 709p.
- GHAUTHERET, R. J. Manual Technique de Culture des Tissus Vegetaux. Paris: Maison Cie, 1942. 334p.

- GOMATHINAYAGAM, P.; RAM, S.G.; RATHNASWAMY, R.; RATHNASWAMY, N.M. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through in vitro embryo culture. *Euphytica*, v.102, n.2, p. 203-209, 1999
- GRIBAUDO, I.; ZANETTI, R.; BOTTA, R.; VALLANIA, R.; EYNARD, I. In óvulo embryo culture of stenospermocarpic grapes. *Vitis*, Siebeldingen, v.32, n.1, p.9-14, Jan. 1993.
- HAISSIG, B.E.; RIEMENSCHNEIDER, E.D. Genetic effects on adventitious rootig. In: DAVIS, T.D.; HAISSING, B.E.; SANKLHA, N. (eds.). *Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Discorides Press, 1988. p. 47-60.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de Embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1988. p.371-394.
- HYNDMAN, S. E.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the used of reduced concentrations of mineral salts. *HortScience*, Mont Vermon, v. 17, p. 82-83, 1982.
- ILLG, R. D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. *Anais ... Brasília: ABCTP/EMBRAPA*, 1986. p.45-47.
- JORDAN, D. B.; FLETCHER, J. S. The relationship between NO₂-accumulation, nitrate reductase and nitrite reductase in suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Plant Science*, Limerick, v. 17, p. 95-99, 1979.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, n. 30, p. 421-427, 1980.
- MAGALHÃES, J. R.; WILCOX, G. E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, Brasília, 22. v.6, p. 576-585, 1987.

- MALLIKARJUNA, N. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. *Euphytica*, v.110, n.1, p. 1-6, 1999
- MEYER, Y.; ABEL, W. O. Studies of wall cell formation. *Planta*, Berlim, v. 123, p. 33-40, 1975.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, June 1962.
- PIERIK, R .L. M. *In vitro* culture of higher plants. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A Cell grow and accumulation of secondary. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. (eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry*. San Diego: Academic Press, 1987. v.4, cap. 5, p. 97-114.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SUKNO, S.; RUSO, J.; JAN, C. C.; MELERO-VARA, J. M.; FERNANDEZ-MARTINEZ, J. M. Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica*, v. 106, n. 1, p. 69-78, 1999.
- WHITE, P. R. *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster, Pennsylvania, Costel and Co. 273p. 1943.

CAPÍTULO 3

RIBEIRO, Lilian de Sousa. *Micropropagação de Coffea arabica L. por meio de Cultura de Tecidos*. Lavras: UFLA, 2001. 25 p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)*

1 RESUMO

Objetivou-se verificar o comportamento de segmentos nodais de *C. arabica* L. de várias cultivares, inoculados em diferentes meios de cultura, e estudou-se também o comportamento do cv Rubi em diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 do meio de cultura MS. Explantes (2,0 cm) preestabelecidos em laboratório foram inoculados em condições assépticas para tubos de ensaio contendo meio de cultura e mantidos em sala de crescimento com $27\pm 1^\circ\text{C}$ e $35 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Após 60 dias, avaliaram-se as características número total de brotos, número de brotos maiores que 1 cm, peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca total, porcentagem de formação de calos, peso da matéria fresca de calos e peso da matéria seca de calos. No experimento 1 usaram-se diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 do meio MS (0; 25; 50; 75; e 100%). Os melhores resultados para o desenvolvimento dos segmentos nodais de *C. arabica* L. foram registrados quando se utilizaram as dosagens de 75% e 100% de KNO_3 . No experimento 2, utilizaram-se os meios MS, Knudson, WPM e White, acrescidos de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de GA_3 + $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, e as cvs. Caturra, Icatu, Catuai e Rubi. Melhores resultados para o desenvolvimento de explantes de *C. arabica* foram registrados quando se utilizaram as cultivares Rubi e Caturra, inoculados no meio básico WPM. Para maioria das variáveis (Peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca total, número total de brotos, número de brotos maiores que um centímetro e porcentagem de formação de calos), o meio de cultura MS destacou-se entre os demais.

*Comitê Orientador: Moacir Pasqual - UFLA (Orientador), Antônio Nazareno Guimarães Mendes - UFLA

RIBEIRO, Lilian de Sousa.. *Coffea arabica* L. micropropagation through tissue culture. Lavras: UFLA, 2001. 25p. (Dissertation - Master Program in Agronomy/Crop Science)*

2 ABSTRACT

The objective was to verify the behavior of nodal segments of *C. arabica* L. of several cvs. inoculated in different culture media, and also the behavior of cv Rubi in different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 of the MD medium. Explants (2,0 cm) preset in laboratory, were inoculated in aseptic conditions for test tubes with culture medium, and maintained in growth room with $27\pm 1^\circ\text{C}$ and $35 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of light intensity. After 60 days the following characteristics were evaluated: total number of sprouts, number of sprouts larger than 1 cm, weight of aerial part fresh matter, total dry matter weight, percentage of callus formation, calluses fresh matter weight and calluses dry matter weight. In the experiment 1 different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 of MS medium were used (0; 25; 50; 75; and 100%). The best results for the *C. arabica* nodal segments development were found when using 75% and 100% of KNO_3 . In the experiment 2, the media were MS, Knudson, WPM and White, added of GA_3 3 mg.L^{-1} + BAP 6 mg.L^{-1} and Caturra, Icatu, Catuai and Rubi cultivars. Better results for the development of *C. arabica* explants were registered when using cvs Rubi and Caturra, inoculated in WPM basic medium. For the majority of variables such as weight of aerial part fresh matter, total dry matter weight, total number of sprouts, number of sprouts larger than 1 cm and callus formation percentage, MS medium was better than the others

*Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFLA (Major Professor), Antônio Nazareno Guimarães Mendes - UFLA

3 INTRODUÇÃO

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de mais larga utilização, da qual, além de outras vantagens, pode-se obter um grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes. O seu uso é apropriado para clonar indivíduos melhorados, produzindo progênes homogêneas. Os métodos disponíveis à propagação *in vitro* permitem obter milhares de plantas selecionadas através da multiplicação de brotos, gemas axilares, pela formação de brotos adventícios ou embriões somáticos. Segundo George (1993), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares.

Uma planta íntegra é um sistema pluricelular altamente diversificado, originado de uma célula inicial única, o zigoto, com seu complemento genético característico. A partir das primeiras divisões, a diferenciação celular se estabelece em diferentes graus, culminando na planta adulta, num sistema de órgãos e tecidos especializados, em que apenas algumas células retêm a capacidade de divisão (Handro e Floh, 1990). A esta capacidade das células vegetais originarem plantas inteiras dá-se o nome de totipotência celular, o que caracteriza a morfogênese e é no que se baseia a micropropagação.

Duas estratégias têm sido utilizadas para a micropropagação em plantas lenhosas: a embriogênese e a organogênese (Einset, 1986). A embriogênese resulta, algumas vezes, em uma alta variação somaclonal, tornando esta estratégia questionável para multiplicação clonal. A multiplicação por organogênese, por outro lado, é um método seguro, que pode ser usado quando a produção de clones de plantas lenhosas for requerida. A micropropagação de brotos explora o efeito da relação auxina/citocinina na regulação do crescimento *in vitro* (Skoog e Miller, 1957).

O controle do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das características da cultura de tecidos vegetais. Estes fenômenos ocorrem cultivando-se os explantes em um meio nutritivo; por isso, é fundamental o conhecimento dos componentes e propriedades dos meios de cultura.

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com macro e micronutrientes, e também com um carboidrato que fornece energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células. Geralmente se utiliza sacarose, pois esse açúcar suporta altas taxas de crescimento das espécies (Caldas, 1990). Segundo os mesmos autores, normalmente incluem-se, ao meio de cultura certos componentes orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, uma vez aplicadas a plantas inteiras ou a segmentos de tecidos vegetais, provocam atividades fisiológicas similares aos hormônios que todas plantas possuem naturalmente e que têm a função de regular os processos metabólicos que envolvem crescimento e desenvolvimento.

As cultivares de *C. arabica* são predominantemente autopolinizadas e, portanto, bastante uniformes, razão pela qual são comumente propagadas por sementes. Contudo, alguns genótipos elites híbridos têm se mostrado resistentes à ferrugem, justificando sua propagação vegetativa como instrumento auxiliar em programas de melhoramento, ou mesmo como atividade comercial (Martins, 1985).

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (Caldas et al., 1990). Segundo Pinto (1998), as espécies respondem diferentemente e, dentro de uma mesma espécie,

as cultivares apresentam exigências diferentes, por isto, a sobrevivência do explante pode variar significativamente entre plantas.

A micropropagação possibilita a obtenção de grande número de plantas em curto espaço de tempo. Afirmções quanto ao potencial de propagação *in vitro* de *C.arabica* têm sido feitas por Dublin (1984, 1991). Cálculos teóricos para *C. arabica*, a partir de cultura de gemas, evidenciam uma capacidade de produzir 13.000 brotos/gema após 15 meses de cultivo contínuo (Medina et al., 1983).

Citocininas vêm sendo adicionadas ao meio de cultura de gemas de *C. arabica*, especialmente cinetina e BAP. Custer et al. (1980) registraram uma taxa de multiplicação de 28 brotos/explante usando 10 mg.L^{-1} de BAP. Sondahl e Loh (1987) relatam que adicionando 11 mg.L^{-1} de BAP ao meio MS, obtêm-se 4,4 novas brotações/gema. Sondahl et al. (1991) afirmam que a taxa de multiplicação é parcialmente controlada pelo nível de citocinina presente no meio de cultura; porém, níveis muito elevados podem induzir mudanças de ordem fisiológica e bioquímica, levando a uma resposta não satisfatória.

Carvalho et al. (1997) identificaram a concentração de 9 mg.L^{-1} de BAP para proliferação de brotos de *C.arabica*; já Berthouly (1999), utilizando GA_3 associado ao BAP, notou que o GA_3 foi responsável pelo alongamento dos explantes de *C. arabica* e *C.canephora*, por um período de 90 dias de cultivo.

Neste trabalho, objetivou-se verificar o comportamento de segmentos nodais de várias cultivares de *C. arabica*, inoculados em diferentes meios de cultura, e verificar o desenvolvimento da cultivar Rubi em diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 do meio MS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais de *C.arabica*, com aproximadamente 2 cm de comprimento, contendo um nó com duas gemas provenientes de plantas preestabelecidas *in vitro*. Foram utilizados tubos de ensaio (25x150mm) que receberam, em média, 15 mL de meio de cultura, foram vedados com tampa plástica e suas bordas protegidas com filme de PVC.

Para o primeiro experimento foi utilizada a cultivar Rubi, variando as fontes de nitrogênio (NH_4NO_3 e KNO_3) do meio básico MS acrescido de 3 mg.L^{-1} de GA_3 e 6 mg.L^{-1} de BAP. Os meios básicos de cultura tiveram seus pHs ajustados para 5,8 antes de serem autoclavados a 121°C e 1,1 atm, por 20 minutos. Os meios foram solidificados com $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar. Os tratamentos consistiram de todas combinações estabelecidas de NH_4NO_3 e KNO_3 do meio MS, num esquema fatorial, nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% das doses estabelecidas no meio básico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×5 , com 4 repetições, 3 tubos por parcela, cada tubo contendo um explante. Utilizou-se o teste de Scott-Knott (1974) para obtenção das análises de médias.

Para o segundo experimento, utilizaram-se quatro diferentes meios nutritivos: MS (Murashige e Skoog, 1962), Knudson (modificado por Arditi, 1967), WPM (Lloyd e McCown, 1980) e White (1943), acrescidos de 3 mg.L^{-1} de GA_3 e 6 mg.L^{-1} de BAP; e as cultivares Rubi (MG 1192), Caturra Amarelo, Acaiá Cerrado (MG 1474), Icatu (4228) e Catuaí Vermelho (IAC144). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×5 , com 4 repetições, 3 tubos por repetição, cada tubo contendo um explante.

Os dois experimentos foram montados em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) e incubados em salas de crescimento com temperatura controlada a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas, sob $35 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Aos 60 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: número total de brotos, peso da matéria fresca da parte aérea e peso da matéria seca total (primeiro experimento); e para o segundo experimento foram avaliados o número total de brotos (NTB), o número de brotos maiores que 1 cm ($\text{NB} > 1\text{cm}$), o peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), o peso da matéria seca total (PMST), a % de formação de calos (%CAL), o peso da matéria fresca de calos (PMFC) e o peso da matéria seca de calos (PMSC). Para obtenção do peso da matéria seca, utilizou-se estufa de secagem na temperatura de 50 °C, por 72 horas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Desenvolvimento de segmentos nodais de *C. arabica* cv. Rubi, inoculados em meio MS com variação nas fontes de Nitrogênio, (Nitrato de Amônio - NH_4NO_3 e Nitrato de Potássio - KNO_3).

Os resultados das análises de variância estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Resumo das análises de variância para as características número total de brotos (NTB), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA) e peso da matéria seca total (PMST). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		NTB	PMFPA	PMST
NH ₄ NO ₃	4	2,43126**	0,030241**	0,000027**
KNO ₃	4	4,444391**	0,014987	0,000022**
NH ₄ NO ₃ x KNO ₃	16	1,217377*	0,012568*	0,000005
Erro	75	0,669259	0,006295	0,000005
CV(%)		45,03	193,53	56,00

*, **, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade

Observa-se que para as características número total de brotos e peso da matéria fresca da parte aérea, houve efeito significativo da interação. Para peso da matéria seca total, houve efeito significativo apenas para Nitrato de Amônio e Nitrato de Potássio.

Número total de brotos:

A utilização de 75% da concentração de KNO₃ no meio de cultura promoveu aumento no número total de brotos até o nível de 50% da recomendação padrão de NH₄NO₃ no meio, registrando-se menor crescimento

em concentrações mais elevadas (Figura 1).

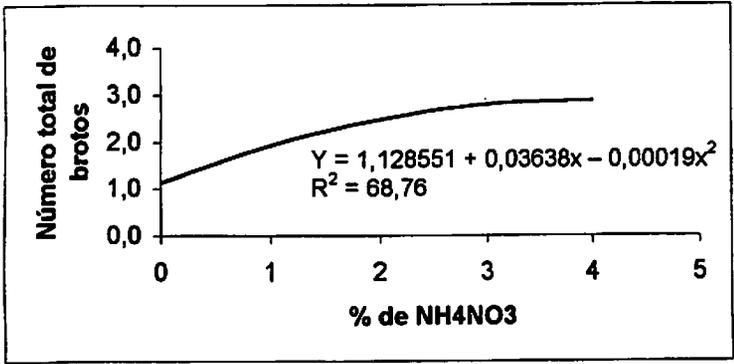


FIGURA 1. Número total de brotos de segmentos nodais de *C. arabica* cv. Rubi, inoculados em meio MS com 75% de Nitrato de Potássio, em diferentes concentrações de Nitrato de Amônio. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da matéria fresca da parte aérea

Tendência similar foi observada na variável PMFPA para a qual a dose de 75% de KNO₃, associada à concentração de NH₄NO₃ 50%, apresentou um maior peso no PMFPA (Figura 2). Concentrações de NH₄NO₃ superiores a 50% e de KNO₃ superiores a 75% resultaram na redução no PMFPA das plantas em estudo.

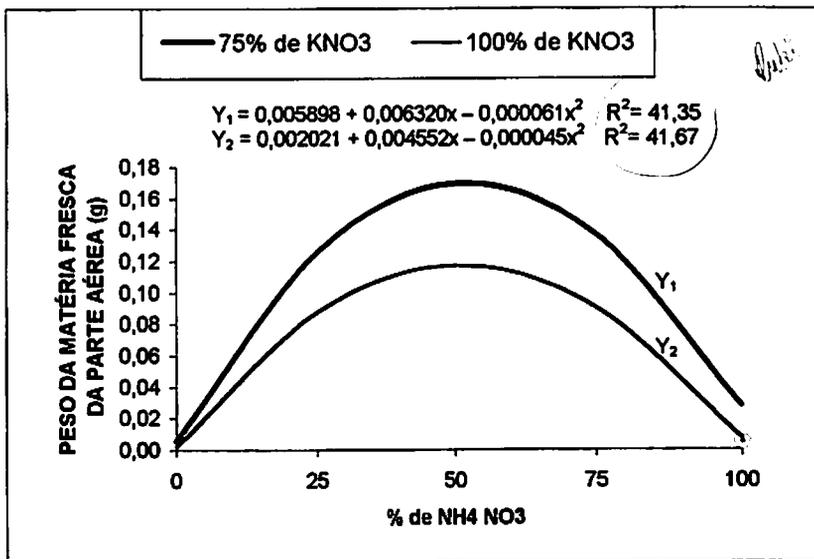


FIGURA 2. Peso da matéria fresca da parte aérea de segmentos nodais de *C.arabica* cv. Rubi inoculado em meio MS com 75 e 100% de Nitrato de Potássio em diferentes concentrações de Nitrato de Amônio. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da matéria seca total:

Maiores valores para peso da matéria seca total foram obtidos à medida que aumentou a concentração de Nitrato de Amônio (Figura 3) e Nitrato de Potássio (Figura 4), evidenciando a importância das duas fontes de nitrogênio no desenvolvimento das plantas *in vitro* de *C. arabica*. Os resultados obtidos confirmam os relatos de Sakuta e Komamime (1987) e Magalhães e Wilcox (1987), segundo os quais o nitrogênio é um dos elementos essenciais e ativos para diversos processos metabólicos da planta, pois é constituinte de várias biomoléculas essenciais, tais como: aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas,

enzimas e outros. Eriksson (1965) conseguiu incrementar a taxa de desenvolvimento da cultura de células de *Haplopappus gracilis* reduzindo a concentração de nitrato de amônio do meio MS para 75%.

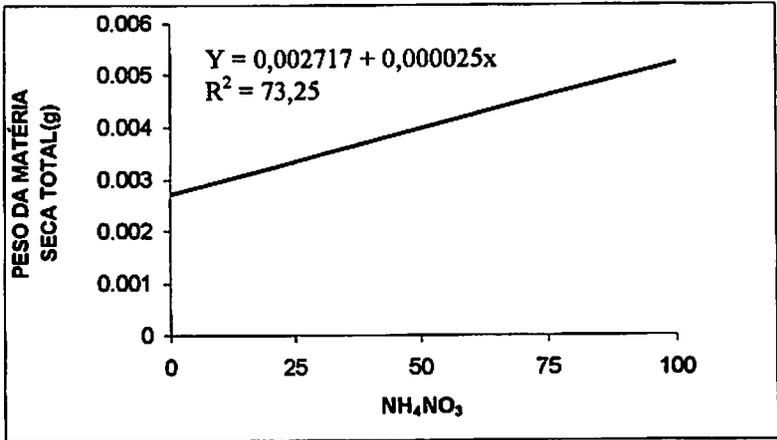


FIGURA 3. Peso da matéria seca total de segmentos nodais de *C. arabica* cv. Rubi inoculados em meio MS, com várias doses de Nitrato de Amônio. UFLA, Lavras-MG, 2001.

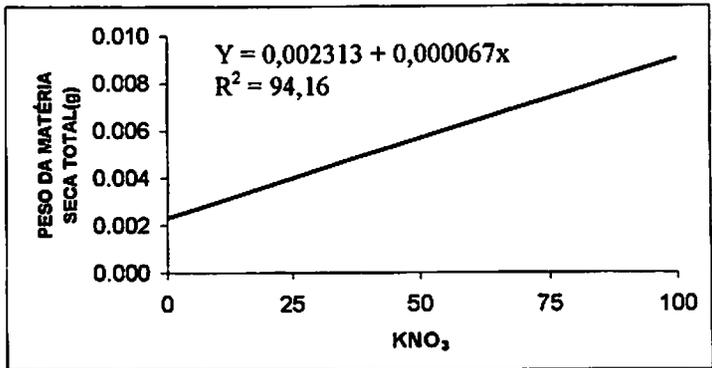


FIGURA 4. Peso da matéria seca total de segmentos nodais de *C. arabica* cv. Rubi, inoculados em meio MS, em diferentes concentrações de Nitrato de Potássio. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Deve-se considerar, também, que a alta concentração de sais do meio MS, comparada a outros meios, especificamente dos níveis de amônio e nitrato, pode ser crítica no processo de morfogênese e crescimento (Sakuta e Komamine, 1987), sendo a demanda energética fornecida pelo metabolismo de carboidratos e a assimilação destes íons diretamente relacionada ao sucesso da cultura *in vitro* (Magalhães e Wilcox, 1987; e Sakuta e Komamine, 1987).

Algumas espécie cultivadas *in vitro* crescem na presença apenas de NO_3 , embora a produção seja normalmente melhor quando há suplemento de NH_4 . A resposta de culturas aos íons nitrato e amônio depende, em grande parte, das enzimas envolvidas na processo e do aumento ou redução de suas atividades pela presença dos íons. Estes fatores variam de acordo com o grau de diferenciação do tecido, sua idade fisiológica e seu genótipo.

Experimento 2: Influência dos meios de cultura (MS, Knudson, WPM e White) no desenvolvimento de segmentos nodais de *C. arabica* cvs. Rubi, Acaiá, Caturra, Catuaí e Icatu.

Os resultados das análises de variância estão apresentados na tabela 2. Observa-se que apenas para as características porcentagem de formação de calos, peso da matéria fresca de calos e peso da matéria seca de calos houve efeito significativo da interação. As demais características apresentaram efeito significativo tanto para meios quanto para cultivares.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para as características número total de brotos (NTB), número de brotos maiores que 1 cm (NB>1cm), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), peso da matéria seca total (PMST), % de calos (%CAL) , peso da matéria fresca de calos (PMFCAL) e peso da matéria seca de calos (PMSCAL). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios						
		NTB	NB>1cm	PMFPA	PMST	%CAL	PMFC	PMSC
Meio	3	18,78147**	2,20119**	0,00825**	0,00031**	1,54583**	0,02123**	0,00051**
Cultivar	4	4,92008**	0,28955**	0,00333*	0,00006**	0,75000**	0,01223**	0,00029**
Meio x cv	12	0,81735	0,14235	0,00098	0,00001	0,40000**	0,00699**	0,00013**
Erro	60	1,04398	0,10231	0,00122	0,00001	0,07916	0,00090	0,00002
CV(%)		41,92	77,55	79,74	42,91	90,04	115,36	110,07

* ,**, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente

Número total de brotos

O número total de brotos dos segmentos nodais variou significativamente em função dos meios básicos de cultura. Os melhores resultados foram observados quando foram utilizados os meios básicos MS e WPM (Figura5). Estas diferenças de comportamento quanto aos meios de cultura podem estar relacionadas a elementos nutricionais presentes de forma diferenciadas nos meios. As cultivares Acaia, Caturra e Rubi, como pode ser observado na Figura 6, mostraram maior número total de brotos, quando comparadas com as demais cultivares. Esta diferença de comportamento entre as cultivares provavelmente está relacionada a fatores genéticos.

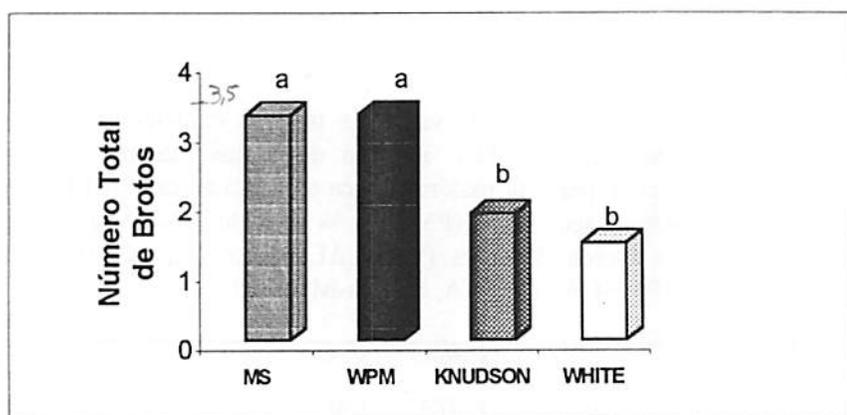


FIGURA 5. Número total de brotos de segmentos nodais de *C.arabica*, inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

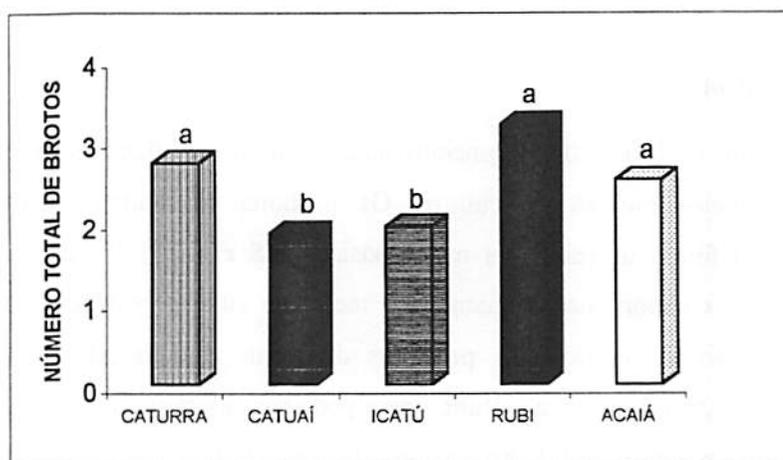


FIGURA 6. Número total de brotos de segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica* UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número de brotos maiores que 1 cm

A variável número de brotos maiores que 1 cm apresentou diferenças significativas quanto ao fator tipos de meios de cultura. As cultivares Caturra, Catuaí, Icatú e Rubi, como pode ser observado na Figura 7, mostraram maior número de brotos maiores que 1 cm, quando comparadas com a cultivar Acaiá. Esta diferença de comportamento entre os cultivares provavelmente está relacionada a fatores genéticos. Pela análise da Figura 8, percebe-se que os meios WPM e MS, à semelhança da característica anterior, foram os melhores dentre os quatro meios estudados. A mesma resposta foi encontrada em estudos com *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae) realizados por Coelho (1999), em que os segmentos nodais foram melhor estabelecidos em meio WPM, quando comparado com o meio MS e outros. Em *Tournefortia cf paniculata* (Bertolucci, 1999), quando se comparou o meio WPM com o meio básico completo do MS, em relação ao tamanho de brotações, notou-se um incremento

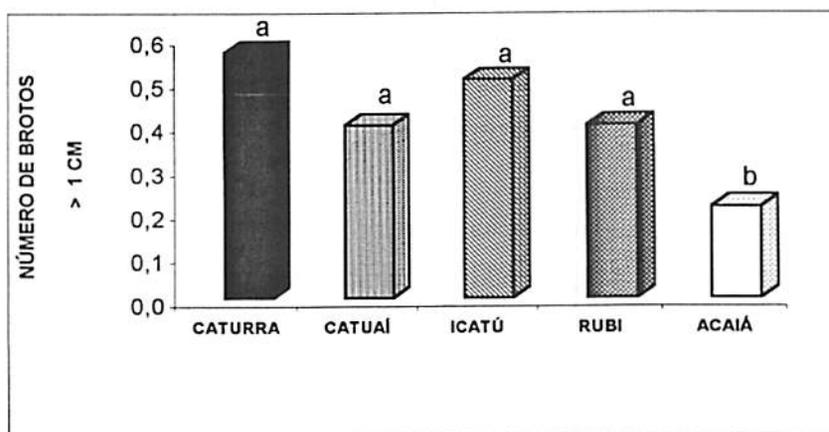


FIGURA 7. Número de brotos maiores que 1 cm de segmentos nodais de *C. arabica* de diferentes cultivares de *C. arabica* UFLA, Lavras-MG, 2001.

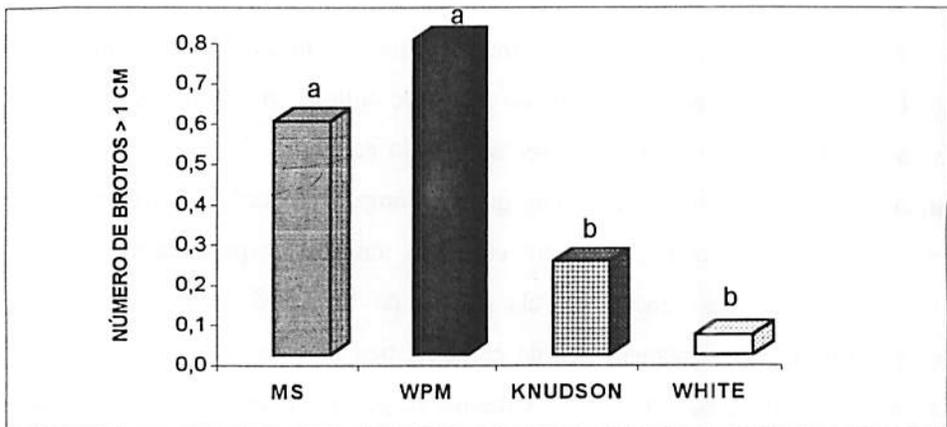


FIGURA 8. Número de brotos maiores que 1 cm de segmentos nodais de *C. arabica* inoculados em diferentes meios básicos de cultura UFLA, Lavras-MG, 2001.

de 30% neste parâmetro, comprovando, assim, a diferença de comportamento entre cultivares de uma mesma espécie relatada por Pinto (1998).

Peso da matéria fresca da parte aérea

O tratamento que proporcionou maior peso da matéria fresca da parte aérea foi o meio básico MS, quando comparado com os demais meios de cultura (Figura 9). Este comportamento dos segmentos nodais de *Coffea arabica* L. pode ser devido à alta concentração de sais deste meio, uma vez que o meio de cultura MS é o meio mais concentrado em termos de micro e macronutrientes. De acordo com Sato et al. (1999), o meio básico utilizado nesta fase de multiplicação, na cultura de tecidos, é o MS; entretanto, diversos trabalhos têm mostrado que a concentração de nitrato de amônio do MS é tóxica. A cultivar Rubi, quando comparada com as demais cultivares, obteve um melhor

desenvolvimento, como pode ser observado na Figura 10, mostrando maior peso da matéria fresca da parte aérea.

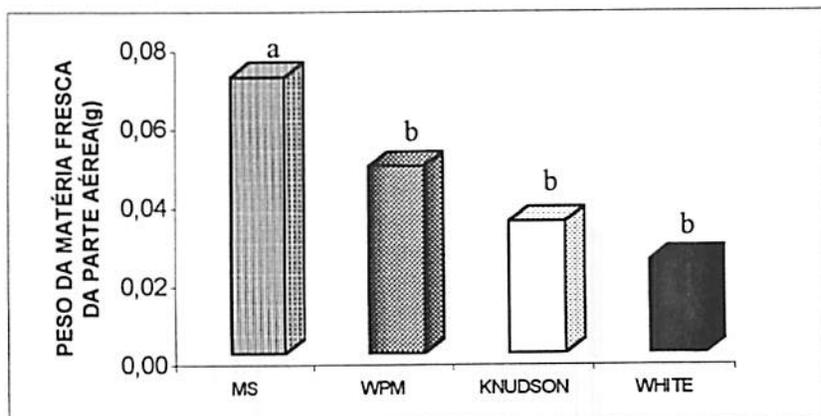


FIGURA 9. Peso da matéria fresca da parte aérea de segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica*, inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

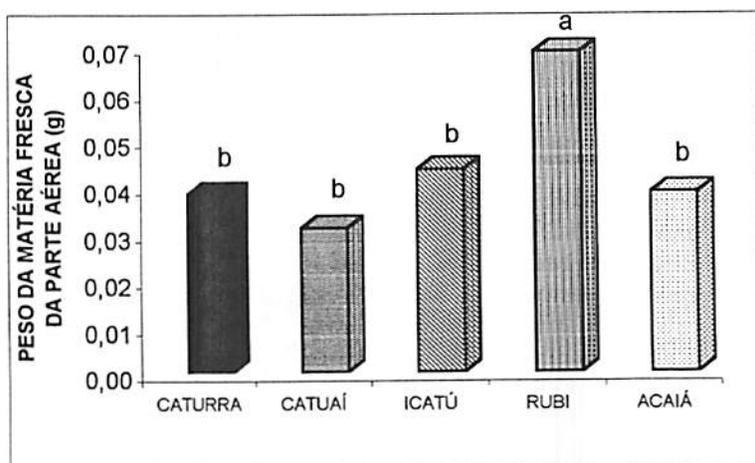


FIGURA 10. Peso da matéria fresca da parte aérea de segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica*. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da matéria seca total

Para a variável peso da matéria seca total, pode-se observar, na figura 11, que os meios de cultura MS e WPM obtiveram o melhor desempenho quando comparados com os demais meios, e a cultivar Rubi obteve o mesmo resultado da variável anterior, destacando-se entre as demais (Figura 12).

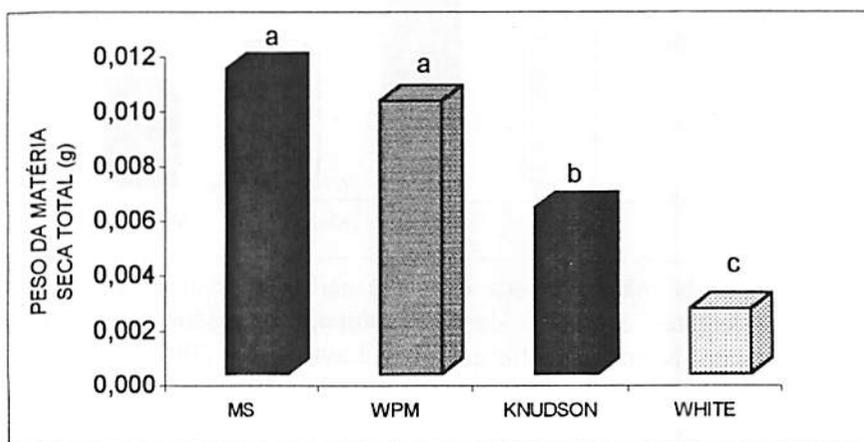


FIGURA 11. Peso da matéria seca total de segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica*, inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001

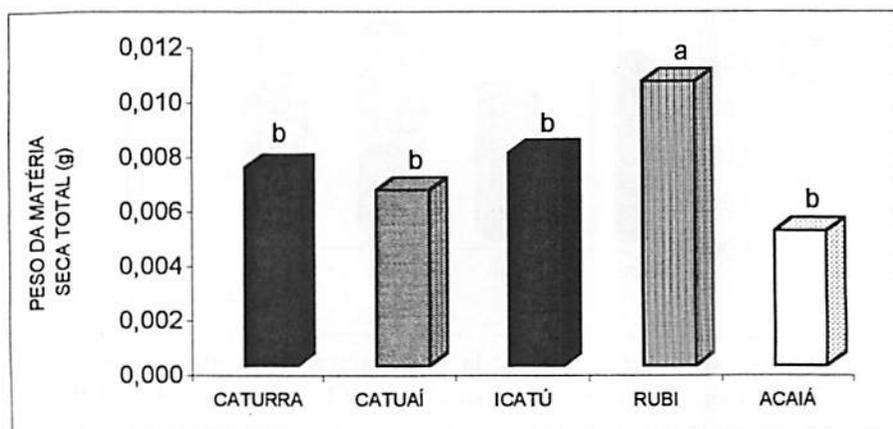


FIGURA 12. Peso da matéria seca total de segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica*. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de formação de calos

A figura 13 evidencia que o melhor resultado para a porcentagem de formação de calos em segmentos nodais, nas cultivares Caturra e Icatu, foi observado quando estas foram inoculadas em meio básico WPM e MS. Para a cultivar Catuai, obteve-se melhor resultado quando os explantes foram inoculados no meio básico WPM, e para cultivar Rubi, maiores índices de formação de calos foram registrados para os meios básicos Knudson e WPM. Para todos os tratamentos houve interação significativa, podendo esta variação ser devida aos componentes dos meios de cultura e/ou a fatores genéticos, conforme afirmam Haissing e Reimenschneider (1988).

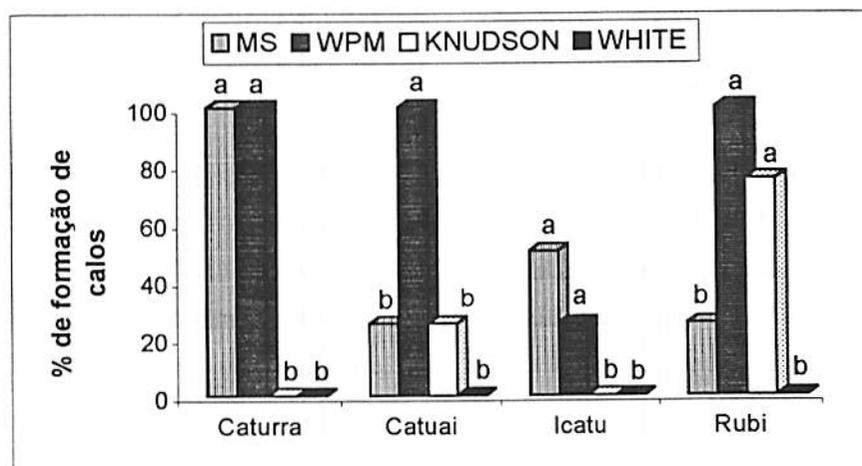


FIGURA 13. Porcentagem de formação de calos dos segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica*, inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG 2001.

Vários fatores relacionados com o explante interferem na calogênese, como: o tamanho do explante, composição do meio de cultura e reguladores de crescimento, órgão fornecedor do explante, a idade e a época do ano em que é colhido o genótipo da planta doadora. A frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionadas com o seu tamanho inicial (Murashige, 1974).

A massa de células desorganizadas, denominada calo, é uma resposta comum quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos. Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante, entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequados (Handro e Floh, 1990; Flick et al., 1986).

Peso da matéria fresca e seca de calos

A interação entre os fatores pode ser observada através da análise de variância (Tabela 2), teste Scott-Knott (1974) e pelo modelo de colunas, em que nota a presença de termos, no modelo, envolvendo os dois fatores. O resultado para o aumento do peso da matéria fresca de calos formados em segmentos nodais variou entre as cultivares de *C. arabica* (Figura 14). Na cultivar Rubi, os meios WPM e Knudson não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao seus pesos da matéria fresca de calos, sendo o meio Knudson superior aos demais. Para peso de matéria seca de calos, o meio WPM foi o meio que se destacou dos demais para as cultivares Caturra, Catuaí e Rubi (Figura 15). As cultivares Caturra, Catuaí e Rubi apresentaram superioridade também nestas características, seguindo a mesma tendência das variáveis anteriores.

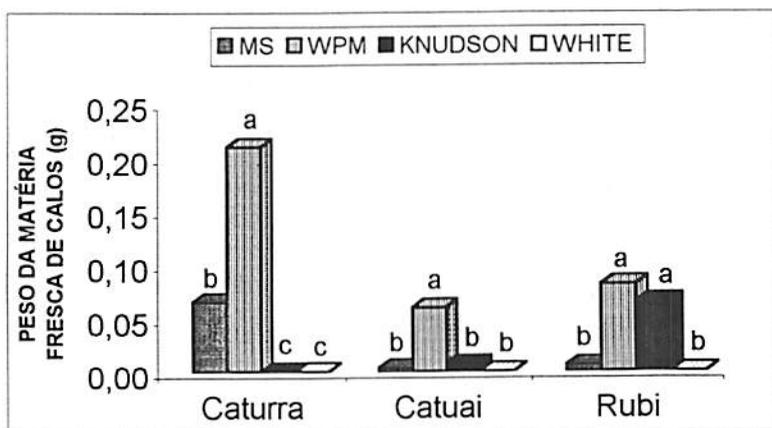


FIGURA 14. Peso da matéria fresca de calos de segmentos nodais de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L., inoculados em diferentes meios básicos de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

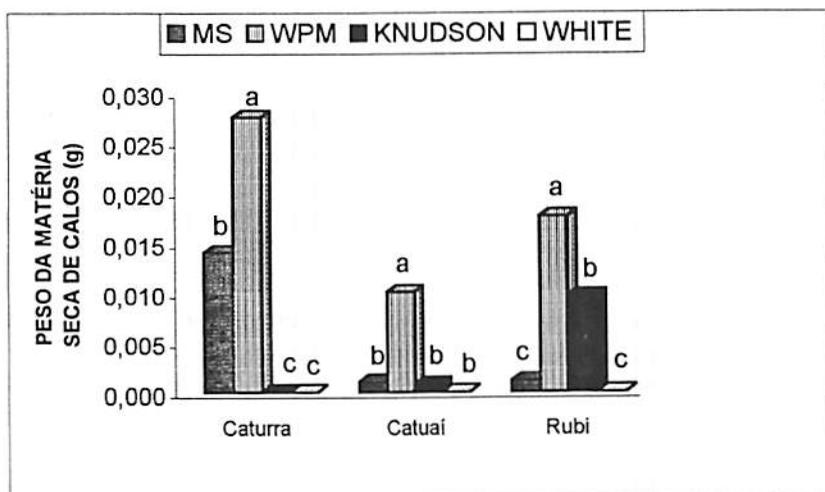


FIGURA 15. Peso da matéria seca de calos dos segmentos nodais de diferentes cultivares de *C. arabica*, inoculados em diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2001.

6 CONCLUSÕES

O meio básico de cultura WPM, na formação de calos, e o meio MS e WPM, no caso da indução de brotações, são os mais eficientes para a cultura de segmentos nodais de explantes de *Coffea arabica* L..

Segmentos nodais das cultivares Caturra e Rubi apresentam melhor comportamento *in vitro*, quando comparadas com as demais cultivares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedlings. *American Journal of Botany*, Columbus, v.54, n.3, p.291-298, Mar. 1967.
- BERTHOULY, M.; DUFOUR, M.; ALVARD, D.; CARASCO, C.; ALEMANNNO, L.; TEISSON, C. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: **INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE**, 16., Kyoto, Japan, 1999. v.2, p.514-519.
- BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham.** Lavras, MG: UFLA, 1999. 79p. (Dissertação – Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica).
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.

- CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L.E.C.; SILVA, A.T. da; SCARANTE, M.J. Efeito do triadimenol e benzilaminopurina no desenvolvimento de brotos *in vitro* do cafeeiro cv. Catuaí. *Revista Unimar*, Marília, v.19, n.3, p.767-775, set. 1997.
- COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. Lavras, MG: UFLA, 1999. 119p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- CUSTER, J.B.M.; van EE, G; BUIJS, L.C. Clonal propagation on *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIQUE CELL COFFEE, 9., 1980, London. *Proceedings...* London: ASIC, 1980. p.588-596.
- DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N.M.; MROGINSKI, L.A. (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Turrialba, 1991. p.612-642.
- DUBLIN, P. Tequniques de reproduction végétative 'in vitro' et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v.28, n.4, p.281-290, oct./dec. 1984.
- EINSET, J.W. A practical guide to woody plant micropropagation. *Arnoldia*, Jamaica Plain, v.46, p.36-44, 1986.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. *Handbook of plant cell culture*. New York: Mac Millan Publishing Company, 1986. cap.2, p.13-67.
- GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.) *Plant propagation by tissue culture: part 1 The technology*. 2.ed. Somerset: England: Exegetics, 1993. cap.2, p.37-66.
- HAISSIG, B.E.; RIEMENSCHNEIDER, E.D. Genetic effects on adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSING, B.E.; SANKLHA, N. (eds). *Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Diossorides Press, 1988. p.47-60.

- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro* In: TORRES, A C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.204-211.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, n.30, p.421-427, 1980.
- MAGALHÃES, J.R.; WILCOX, G.E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.6, p.576-585, jun. 1987.
- MARTINS, A.B.G. **Uso de reguladores de crescimento no enraizamento de estacas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Viçosa: UFV, 1985. 23p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- MEDINA, H.P.F.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.M. Coffee breeding and related aspects. In: JANICK, J. (ed.). **Plant breeding reviews**, Westport: Connecticut, 1983. p.157-194.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.153-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, June 1962
- PINTO, J.E.B.P. **Fatores que afetam o crescimento e a morfogênese**, Lavras: UFLA. 1998. 6p. (Apostila).
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A Cell grow and accumulation of secondary. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (eds). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic Press, 1987. v.4, cap.5, p.97-114.

- SATO, A.Y.; MARIA, J.; JUNQUEIRA, C.S. Efeito da concentração de nitrato de Amônio no desenvolvimento *in vitro* da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com e sem BAP. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.78, jun. 1999. (Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília.)
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* (Biological action of growth substances). **Symposium of the Society Experimental Biology**, v.11, p.116-131, 1957.
- SONDAHL, M.R.; LOH, W.H.T. Coffee Biotechnology. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (eds). **Coffee**. London: Agronomy, 1987. v.4, p.235-264.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagación 'in vitro' del café. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. (eds). **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones**. Turrialba, 1991. p.621-642.
- WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster, Pennsylvania: Costel e Company, 1943. 273p.