

**COMPORTAMENTO DE CAFEEIROS
PROPAGADOS VIA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA**

GUSTAVO RENNÓ REIS ALMEIDA

2007

GUSTAVO RENNÓ REIS ALMEIDA

**COMPORTAMENTO DE CAFEIROS PROPAGADOS VIA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

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

Orientador

Prof. Dr. Rubens José Guimarães

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Almeida, Gustavo Rennó Reis

Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática /
Gustavo Rennó Reis Almeida. -- Lavras : UFLA, 2007.

57 p : il.

Orientador: Rubens José Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Micropropagação. 3. Embriogênese somática. 4. Sistema
radicular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7323

GUSTAVO RENNÓ REIS ALMEIDA

**COMPORTAMENTO DE CAFEIROS PROPAGADOS
VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

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

APROVADA em 15 de março de 2007.

Pesq. Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho EMBRAPA Café

Pesq. Dra. Lílian Padilha EMBRAPA Café

Prof. Dr. Rubens José Guimarães

UFLA

(Orientador)

A Deus, que nos presenteia com o livre arbítrio, nos abençoa com raciocínio e nos alimenta a cada dia com a vontade de lutarmos pelos nossos objetivos.

OFEREÇO.

A minha mãe, Regina Maria Rennó Reis Almeida,
pois o seu apoio foi fundamental para a
concretização deste trabalho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura, pela dedicação, oferecendo cursos de alta qualidade.

À Fundação Procafé, que me incentivou desde o início, dando todo o suporte necessário para a realização da pesquisa.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, pela concessão de bolsa de estudo, permitindo a realização deste e de outros trabalhos.

Ao amigo, Pesquisador Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, da Embrapa Café, que foi o grande responsável pela concretização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Rubens José Guimarães, do qual me orgulho ter como orientador, por ter depositado em mim grande confiança na execução deste trabalho, a que espero ter correspondido.

Ao Pesquisador Dr. João Batista Teixeira, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que gentilmente cedeu as mudas propagadas via embriogênese somática.

Ao Pesquisador Dr. Antônio Alves Pereira (Tônico), da EPAMIG de Viçosa, que cedeu os clones de cafeeiros (H 427-3-4), os quais gentilmente trouxe pessoalmente a Varginha.

Ao Professor Dr. Itamar Ferreira de Souza, que me recebeu na UFLA e me orientou nos meus primeiros passos do mestrado e por quem tenho grande gratidão.

À Cooperativa dos Cafeicultores da Zona de Varginha (MINASUL), minha atual casa, onde tenho todo apoio para realizar meus estudos e sempre incentivou para a concretização do mestrado.

A minha namorada, Rosiana, que está presente em cada passo da minha vida e a quem dedico todo o meu amor.

A toda a minha família: minha mãe, vó Nair, vó Tereza, Rodrigo, Marcelo, Vanessa, Vitor, tios, primos e pessoas que estão juntas nas horas boas e ruins da vida.

Aos amigos da Fundação Procafé que trabalharam diretamente na execução deste trabalho, a quem tenho grande gratidão: Tiago de Souza, Rogério Pinto Reis, José Marcos Mendonça, Éder Cazelato, Rodrigo Naves e Navantino Fioravante.

Aos amigos que fiz na Fundação Procafé, que muito colaboraram, motivando para a realização deste trabalho: Antônio Wander, José Edgar, Leonardo Japiassú, Lílian Padilha, André Garcia, Matiello, Saulo Almeida, Ferroni, Miguel, Roque, Maria Emília, Douglas, Joice, Simone, Claudinha, Karina, Maria da Encarnação, Clair e Arisson.

Às pessoas que conheci no Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras, onde fiz grandes amizades.

Aos meus colegas de trabalho, com os quais convivo todos os dias e que sempre me ofereceram apoio: Ronaldo Vilas Boas, Adriano Resende, Silvio Almeida, Guilherme Frota, Cláudio Rosendo, Neuza Luiz, Guilherme Salgado, João Lincon, Henrique José, Ronan Resende e Osvaldo Henrique.

A todos que, de uma forma ou de outra, são responsáveis pela concretização deste trabalho e que não foram citados, mas não deixam de ter meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática.....	
embriogênese somática.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	02
2 REFERENCIAL TEÓRIO.....	04
2.1 Aspectos gerais.....	04
2.2 Propagação vegetativa.....	06
2.3 Embriogênese somática.....	07
2.4 Sistema radicular do cafeeiro.....	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPÍTULO 2: Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática em diferentes níveis de água no solo.....	
embriogênese somática em diferentes níveis de água no solo.....	21
1 RESUMO.....	22
2 ABSTRACT.....	23
3 INTRODUÇÃO.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO 3: Comportamento em condições de campo de cafeeiros propagados via embriogênese somática.....	
propagados via embriogênese somática.....	40
1 RESUMO.....	41
2 ABSTRACT.....	42
3 INTRODUÇÃO.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÕES.....	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5

RESUMO

ALMEIDA, Gustavo Rennó Reis. **Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática**. 2007. p 57. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A micropropagação do cafeeiro permite a multiplicação de híbridos e de genótipos em segregação e reduz de 30 para, aproximadamente, 10 anos, o tempo necessário para a obtenção de novas cultivares de café. Entretanto, esta técnica ainda não está otimizada para a propagação em larga escala de *Coffea arabica* L. e o comportamento em condições de campo das plantas produzidas por este processo ainda é pouco conhecido. Este trabalho objetivou estudar o comportamento de plantas propagadas via embriogênese somática indireta. Foram realizados dois ensaios, comparando-se plantas propagadas por embriogênese somática com plantas oriundas de sementes. O primeiro foi conduzido em casa de vegetação, para estudar a morfologia do sistema radicular e a resposta à falta e ao excesso de água no solo. O segundo ensaio foi conduzido no campo para avaliar o crescimento vegetativo durante os primeiros meses pós-plantio. No ensaio em casa de vegetação, as plantas propagadas por embriogênese somática apresentaram crescimento vegetativo significativamente maior que as plantas propagadas por semente em massa seca de folhas e de caule, altura e número de nós do ramo ortotrópico. A resposta ao excesso ou à falta de água no solo foi semelhante para os dois métodos de propagação. No ensaio de campo, as plantas provenientes de embriogênese somática apresentaram maior crescimento vegetativo durante os sete primeiros meses de cultivo, para todas as características avaliadas. Concluiu-se que plantas propagadas por embriogênese somática apresentam maior desenvolvimento vegetativo durante os primeiros meses de cultivo e, mesmo ao excesso ou à falta de água no solo, que plantas provenientes de sementes.

-
- Comitê Orientador: Rubens José Guimarães – UFLA (Orientador)
 -

2 ABSTRACT

ALMEIDA, Gustavo Rennó Reis. **Performance Of Somatic Embryogenesis Propagated Coffee Plants**. 2007. p.57. (Dissertation – Master in Agronomy/ Crop Science) – University Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Vegetative propagation of coffee by somatic embryogenesis (SE) is an important tool in genetic breeding programs, as allows the multiplication of hybrids and segregating genotypes and the reduction of the time required to the release of new cultivars. However, very few is known about the performance of SE derived plants in soils with low water availability. This work was conducted to evaluate the effect of different levels of soil water availability in coffee plants propagated by SE as compared with plants propagated by seeds. An experiment was carried out under green house conditions, using a 4x2 factorial treatment design, with four soil water levels (40%, 70%, 100% e 130% of the field capacity), and two propagation methods (SE and seeds), using six months old plants of the Catuaí Vermelho IAC 44 cultivar. The following parameters were evaluated: leaves, stems and roots dry weight, foliar area, height, stem diameter, root length, number of plagiotropic branches and number of nodes in the orthotropic branch. It was found that SE propagated plants and seed derived plants show similar development under conditions of low water availability, and that the root system of coffee plants propagated by SE is not a limiting factor, and can even contribute to the growth of the plants during the first months after planting.

-
- Guidance Committee: Rubens José Guimarães – UFLA (Adviser)

Capítulo 1

Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas nacionais e possui também grande expressão no mercado internacional, trazendo riquezas para o país e gerando empregos.

Para se manterem competitivos no mercado e preparados para se adaptarem às leis trabalhistas, às leis ambientais cada vez mais rigorosas e à segurança alimentar, os cafeicultores buscam, cada vez mais, tecnologias que visem à redução de custo, maior rentabilidade e melhoria contínua da qualidade do produto. Assim, busca-se a sustentabilidade cada vez maior no processo, preservando o meio ambiente e melhorando a qualidade de vida das pessoas que estão ligadas, direta ou indiretamente, com a produção de café.

Na cafeicultura, os trabalhos com o melhoramento genético vêm ao encontro das exigências competitivas do setor. A utilização de cultivares de cafeeiros mais adaptadas às diferentes regiões e o manejo sustentável favorece a redução do uso de agrotóxicos, a redução de perdas nas produções e garantem melhor rentabilidade para os produtores. Por outro lado, o período para o desenvolvimento de genótipos superiores de café é longo e trabalhoso, pois, para a obtenção de uma cultivar com características agronômicas desejáveis e com pouca segregação genética, são necessários cerca de 30 anos. A redução deste tempo ou meios para a substituição deste processo sempre foi um desafio para a ciência.

Genótipos de *Coffea canephora* são propagados vegetativamente por meio de estacas. Isto é possível porque esta espécie possui características agronômicas com maior volume de brotações, das quais são retiradas as estacas. Por outro lado, a clonagem por estacas é menos aplicada para *C. arabica*, que

possui um baixo volume de brotações, dificultando o uso desta tecnologia de propagação.

A propagação vegetativa *in vitro*, ou micropropagação tem se mostrado bastante útil para auxiliar no trabalho de melhoramento genético de *C. arabica*. Esta técnica possibilita a multiplicação em larga escala de plantas matrizes com características de grande interesse agrônomo, tais como boa produtividade, tolerância ao estresse hídrico, resistência a pragas e doenças e excelente vigor, dentre outras.

A micropropagação do cafeeiro pode ser realizada utilizando-se dois procedimentos: embriogênese somática direta e indireta. A tecnologia de embriogênese somática indireta em cafeeiros, apesar de muito promissora ainda, suscita dúvidas quanto ao comportamento das plantas em condições de campo, principalmente em relação ao sistema radicular. Outras questões são levantadas, como, por exemplo, a possibilidade de variação somaclonal devido ao longo tempo *in vitro*, a longevidade e possíveis variações no desenvolvimento destas plantas no campo.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a resposta de plantas propagadas via embriogênese somática ao estresse hídrico, a morfologia do sistema radicular e o crescimento vegetativo durante os primeiros meses pós-plantio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais

As espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre são as únicas cultivadas em grande escala nas diversas regiões cafeeiras do mundo e representam praticamente 100% de todo o café comercializado. O café arábica participa com cerca de 70% da produção mundial e o café robusta, com 30% (Matiello et al., 2005).

O café é o segundo maior gerador de divisas no mundo, perdendo apenas para o mercado do petróleo. Gera, anualmente, de 12 a 13 bilhões de dólares, com a exportação de, aproximadamente, 60 milhões de sacas (Guimarães et al., 2002).

A cultura que mais se desenvolveu nas regiões tropicais é o café, produzindo riquezas, gerando empregos, fixando o homem no campo e contribuindo, de forma decisiva, para elevar o nível social das populações rurais. O estado de Minas Gerais responde por mais de 50% da produção nacional, sendo a região Sul de Minas responsável por 25% da produção nacional, ou 50% da produção do estado (FAEMG, 1996).

A espécie *C. arabica* L. é originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, em uma região restrita e marginal às demais espécies, entre 1.000 a 3.000 m de altitude (Carvalho, 1946). Possui mais de 40 mutantes e muitas variedades. É tetraplóide, autofértil, ocorrendo de 10% a 12% de fecundação cruzada. O caule único dá origem a folhas, ramos plagiotrópicos e, em determinadas situações, a outros ramos ortotrópicos. Os ramos plagiotrópicos, por sua vez dão origem a folhas e ramos plagiotrópicos secundários, terciários ou de maior ordem, que originarão as flores e, conseqüentemente, os frutos. As folhas têm coloração verde-escura, são elípticas

e possuem lâminas brilhantes e domáceas visíveis. Quando maduros, os frutos são drupas amareladas ou avermelhadas, possuindo superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada e, na base, aloja-se o embrião (Graner & Godoy Júnior, 1967). Possui 44 cromossomos e a taxa de fecundação cruzada é de, aproximadamente, 10%, o que é considerado, no melhoramento genético, como uma espécie autógama. Por esta razão, o melhoramento do café arábica tem por base a obtenção de linhagens puras por seleção genealógica depois da recombinação de caracteres aportados pelos pais (Berthouly, 2000).

A espécie *Coffea canephora* Pierre tem origem em uma extensão geográfica bastante ampla, nas regiões ocidental, centro-tropical e subtropical do continente africano, em altitudes de até 1.300 metros e precipitações entre 1.500 e 2.000 mm anuais. É uma espécie diplóide com 22 cromossomos, que apresenta incompatibilidade gametofítica, multiplicando-se por fecundação cruzada, sendo a polinização realizada principalmente pelo vento. Atualmente, se distribui amplamente pelo continente africano e em algumas regiões da América, caracterizadas por menores altitudes e temperaturas mais elevadas, com média anual de 22° a 26°C (Mendes & Guimarães, 1998). No Brasil, a espécie *C. canephora* é cultivada em maior escala no estado do Espírito Santo, sendo utilizada, principalmente, a cultivar Conilon. (Guimarães et al., 2002).

O café é um produto bem antigo no Brasil. Sua introdução foi realizada em 1727, quando o sargento Francisco Mello Palheta introduziu uma pequena quantidade de sementes e mudas da cultivar Tipica na região norte do país, mais precisamente em Belém, no estado do Pará. Posteriormente, em 1845, foi introduzida a cultivar Bourbon Vermelho e, em 1850, a cultivar Sumatra (Carvalho, 1946).

Carvalho (2005) relata que os trabalhos de melhoramento genético do cafeeiro tiveram início no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na década

de 1930. A partir do início da década de 1940, grandes avanços foram obtidos pelo programa de melhoramento genético desta instituição. Nas décadas de 1940 e 1950, com a seleção da cultivar Mundo Novo e, posteriormente, nas décadas de 1950 e 1960, com a obtenção da cultivar Catuaí, a cafeicultura brasileira tornou-se mais eficiente e competitiva. Com os trabalhos de melhoramento no Brasil, executados até os dias atuais, foram obtidos ganhos consideráveis em produtividade, possibilitando um aumento de produção de cerca de 295% em relação à cultivar Típica. Atualmente, existem mais de 100 cultivares registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre adaptadas para diferentes condições ambientais.

2.2 Propagação vegetativa

No cafeeiro, a propagação vegetativa é praticada, principalmente, em *C. canephora* Pierre, devido à dificuldade de reprodução uniforme por via sexuada. Em *C. arabica* L., a multiplicação é menos utilizada (Berthouly, 2000). A dificuldade de estabelecimento de um protocolo para a propagação vegetativa *in vivo* de *C. arabica* pode estar relacionada à variabilidade de respostas encontradas para as diferentes cultivares, com relação aos fatores que afetam o enraizamento (Carvalho, 2005).

A propagação vegetativa via enraizamento de estacas de *C. arabica* L. justifica-se pela possibilidade de exploração comercial de genótipos com alta produção, resistência a pragas e doenças e outras características desejáveis (Sondahl et al., 2000) e, mesmo, para a manutenção de materiais de interesse ainda em heterozigose, servindo como instrumento auxiliar em programas de melhoramento (Martins, 1985).

A capacidade de enraizamento e a qualidade e a quantidade de raízes nas estacas propagadas vegetativamente variam entre espécies e cultivares, condições ambientais e condição interna da própria planta. Estes fatores têm sido

amplamente discutidos por autores como Carlson (1966); Cheffins & Howard (1982) e Couvillon & Erez (1980).

Outra forma de propagação vegetativa é a cultura de tecidos vegetais, que compreende um conjunto de técnicas na qual um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de assepsia, em um meio nutritivo artificial. Estas culturas são tratadas adequadamente por meio de um balanço nutricional e hormonal, sob condições ambientais controladas. O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa e com constituição idêntica à planta matriz (Pasqual, 2001).

Para Andrade (1998), a cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala. Ela é sendo importante, principalmente, para as culturas de ciclo longo, podendo ser uma técnica complementar aos métodos convencionais de melhoramento genético. Pereira (2005) relata que, por meio de técnicas como cultura de embriões, de anteras, de células somáticas e de manipulação genética *in vitro*, têm-se resultados promissores na obtenção mais rápida de genótipos superiores.

2.3 Embriogênese somática

A técnica de cultura de tecidos em cafeeiro teve como pioneiros os trabalhos de Staritsky (1970), que descreveu a indução de embriões somáticos e plântulas oriundas de ramos ortotrópicos de *C. canephora*. Estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver o melhor meio de cultura, aumentar a taxa de multiplicação e os melhores protocolos com as doses ideais para os reguladores de crescimento, incluindo *C. arabica* (Ribeiro, 2001).

Para Maciel (2001), dentro das aplicações da micropropagação de plantas, destaca-se a embriogênese somática, apresentando grande potencial a ser explorado, capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos oriundos de programa de melhoramento genético convencional que ainda demandam tempo para serem disponibilizados no mercado.

Existem os métodos direto e indireto para o desenvolvimento de embriões via embriogênese somática. A embriogênese somática direta consiste na formação dos embriões somáticos diretamente de tecidos matrizes, sem a formação de estágios intermediários de calos. Por outro lado, na embriogênese somática indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação. Em ambos os métodos, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, torpedo e cotiledonar (Guerra et al., 1999).

Diversos trabalhos foram realizados utilizando a cultura de tecidos para a propagação de cultivares comerciais de café, no intuito de aumentar a taxa de multiplicação. Foram estudados tipos de meio de cultura, relação ideal entre reguladores de crescimento, regeneração de plantas por meio de neoformação de gemas, de secção de entrenós verdes, de ramos ortotrópicos e por indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares (Andrade, 1998; Bandel et al., 1975; Boxtel & Berthouly, 1996; Cordeiro, 1999; Custer et al., 1980; De Pena, 1983; Dublin, 1980; Herman & Hass, 1975; Lanaud, 1981; Maciel, 2001; Pereira, 2005; Puerson et al., 1983; Resende, 2005; Ribeiro, 2001; Sondahl & Sharp, 1977; Sondahl, 1978; Sondahl et al, 1984; Sondahl et al., 1991; Sreenath, 2000; Teixeira et al., 2005).

Na embriogênese somática, normalmente, são empregados, pelo menos, dois meios de cultura. O primeiro é utilizado para a indução da embriogênese

somática, enquanto o segundo meio permite o desenvolvimento dos embriões somáticos (Guerra et al., 1999). O suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura é essencial para o cultivo *in vitro*, podendo variar de acordo com a espécie vegetal e o processo de cultivo. A indução da embriogênese somática em explantes vegetais, assim com a multiplicação e o crescimento de plântulas, é bastante dependente da composição dos nutrientes minerais no meio de cultura (Monteiro-Hara, 2000).

Segundo Sondahl & Sharp (1977), no processo de embriogênese somática indireta em cafeeiro, os embriões surgem de calos primários não diferenciados, os quais são de cor marrom, globulares e compactas, ficando situados nos bordos dos explantes e são observados em, no máximo, 20 embriões/explante. Os embriões surgem também de calos secundários embriogênicos friáveis, que originam cerca de 100 a 300 embriões/explante, quando cultivados em meio de cultura semi-sólido.

Após a formação de embriões somáticos globulares, passa-se para uma nova fase de desenvolvimento de embriões. Biorreatores podem ser empregados para a produção em larga escala das culturas nesta nova fase. Esses pró-embriões são estimulados a prosseguir seu desenvolvimento pela retirada das auxinas no meio, inclusão de ABA, citocininas e agentes que promovam estresse osmótico. Nesta fase, as culturas são mantidas em condição de luminosidade e ocorre a maturação dos embriões somáticos, que podem ser convertidos em plantas ou, então, encapsulados para a obtenção de sementes sintéticas (Guerra et al., 1999).

O processo de aclimatização representa uma etapa importante na cultura de tecidos, sendo um fator limitante no processo de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1990). Este processo consiste na retirada e transferência das plântulas do meio de cultivo *in vitro* para outro tipo de substrato e ambiente, promovendo uma adaptação gradativa (Moreira, 2001).

Segundo Catunda (2004), o processo de aclimatização é crucial para a obtenção de mudas de alta qualidade provenientes da cultura de tecidos. A otimização neste processo envolve o suprimento adequado de nutrientes, o uso de substratos adequados, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento e o controle do ambiente de cultivo, entre outros cuidados.

O estresse hídrico das plântulas é, geralmente, o maior problema encontrado no transplântio. Embora as plântulas sejam aparentemente perfeitas, elas apresentam uma série de deficiências anatômicas, induzidas pela condição *in vitro*, que dificultam o controle da transpiração e ocasionam rápida perda de água. Entre as deficiências podem ser citadas: pequena formação de ceras epicuticulares e baixa funcionalidade dos estômatos sob condição de baixa umidade relativa do ar (Sutter, 1988); aumento na densidade estomática (Wetzstein & Sommer, 1982); localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha (Capellades et al., 1990); reduzida diferenciação dos mesófilos das folhas e alta proporção de espaços intercelulares (Capellades et al., 1990; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997); deficiente conexão entre o sistema vascular do caule e raízes (Grout & Aston, 1977); raízes são, de modo geral, quebradiças, pouco funcionais na absorção de nutrientes e, freqüentemente, morrem ao serem transferidas para o solo (Grout & Aston, 1977; George, 1996; Leite, 1995; Zimmerman, 1981). Entretanto, alguns autores comprovam a eficiência do sistema radicular formado *in vitro* e a sobrevivência após a transferência para as condições *ex vitro* (Carvalho, 1997; Díaz-Pérez et al., 1995; Hicks, 1987; Sutter & Luza, 1993).

2.4 Sistema radicular do cafeeiro

A capacidade de absorção de água pelo sistema radicular é um dos fatores determinantes da produtividade do cafeeiro. A reposição da água transpirada pela copa é vital para a manutenção da turgescência do ramo, folhas

e frutos, permitindo que ocorram os vários processos metabólicos relacionados direta ou indiretamente, com o crescimento e o desenvolvimento. Por outro lado, o fluxo contínuo de água, desde as extremidades das raízes até os terminais dos ramos via xilema, possibilita a translocação dos sais minerais absorvidos do solo e de vários metabólicos (glutamina e asparagina) e alguns hormônios (giberelina e citocinina), produzidos pelas próprias raízes, os quais são indispensáveis para o funcionamento normal da planta, incluindo o crescimento de gemas e frutos e a retenção de folhas e clorofila (Kumar, 1979).

As raízes são centros obrigatórios de importação de fotoassimilados (drenos), armazenando o produto da fotossíntese quando o consumo da planta é menor que a produção. Grandes prejuízos aos cafeeiros podem ocorrer na situação inversa, ou seja, quando a produção de fotoassimilados é menor que o consumo da planta, pois as raízes têm menor força de dreno que as folhas novas e frutos, podendo ocorrer paralisação do crescimento e, até mesmo, a morte do sistema radicular (Rena & Maestri, 1986).

A não eficiência do sistema radicular ocasionará, nas plantas, déficits hídricos, afetando praticamente qualquer aspecto do crescimento das plantas, inclusive a anatomia, a morfologia, a fisiologia e a bioquímica. O tamanho da planta é reduzido por uma diminuição do crescimento celular e a fotossíntese, pela diminuição da área foliar, pelo fechamento estomático e por danos no aparelho fotossintético (Benincasa & Leite, 2002).

Nutman (1933) descreve o sistema radicular do cafeeiro com as seguintes características morfológicas e estruturais: (1) raiz pivotante: raiz curta e grossa, freqüentemente múltipla, terminando abruptamente e raramente estendendo-se além de 45cm abaixo da superfície do solo. Por esta razão, não se pode afirmar que o cafeeiro possua uma raiz pivotante típica e, sim, pseudopivotante. Mudanças mal formadas podem ocasionar defeitos nesse tipo de raiz, chegando ao extremo de levar a planta à morte. A poda drástica dessa raiz,

durante a operação de repicagem de mudas ou, mesmo, durante o plantio, pode causar uma bifurcação, fazendo com que o desenvolvimento do sistema radicular seja prejudicado (Guimarães et al., 2002). Conseqüentemente, menor será a capacidade de absorção de nutrientes e a resistência à seca. Lavouras plantadas com sistemas radiculares comprometidos com “garfo” ou “pião torto” apresentam morte acentuada de plantas após a primeira produção, quando o sistema radicular é exigido e não suporta a carga pendente (Rena & Maestri, 1986); (2) raízes axiais: têm crescimento vertical descendente abaixo do tronco, em número de quatro a oito; são, geralmente, originadas de ramificações da pivotante, alcançando profundidades de 2,5 a 3,0 metros, ramificando-se em todas as direções e em todas as profundidades; (3) raízes da placa superficial: crescem mais ou menos de forma paralela à superfície do solo, até distâncias de 1,3m a 2,0m do tronco, em geral ramificando-se horizontalmente, mas, podendo também se ramificar em outras direções e (4) raízes laterais fora da placa superficial: são, em geral, de origem mais profunda que as anteriores, ramificando-se uniformemente no solo e tornando-se verticais (Nutman, 1933).

Guiscafré et al. (1938) descreveram, em seu trabalho, que 94% das raízes do cafeeiro se encontram nos primeiros 30 cm de profundidade e praticamente 100% de todo o sistema radicular está nos primeiros 60 cm. Após este trabalho, os valores foram ajustados por outros autores, mas sempre concordando que o cafeeiro é uma planta de sistema radicular superficial (Bull, 1963; Castro, 1960; Del Rio et al, 1961; Franco & Inforzato, 1946; Garriz, 1978; Huxley et al., 1974; Huxley & Turk, 1976; Inforzato & Reis, 1974; Matiello & Souza Dantas, 1987; Nick et al., 1994; Rodrigues et al., 1996). Entretanto, DaMatta (2004) considera que, para que a planta de café seja adaptada à seca, seu sistema radicular deve ser profundo e vigoroso e, para conseguir boas produções, além de ser profundo, deve ter raízes em abundância e bem ramificadas (Matiello et al, 2005; Trench, 1934; Wellman, 1961).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. M. da C. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fiotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BANDEL, G.; CARVALHO, F. J. P. C.; CRÓCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; GUTIERREZ, L. E.; CARVALHO, P. C. T. Aspectos citológicos da diferenciação de tecidos de cafeeiros *in vitro*. **Anais da “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, v. 32, p. 717-724, 1975.

BENINCASA, M. M. P.; LEITE, I. C. **Fisiologia vegetal**. Jaboticabal: Funep, 2004. 169 p.

BERTHOULY, M. Biotecnologias aplicadas al mejoramiento genético del cafetero. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina, **Proceedings...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 9-22.

BOXTTEL, J. V.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 7-17, Jan. 1996.

BULL, T. A. Studies on the effect of mulch and irrigation on root and stem development in *Coffea arabica* – I: changes in the root system induced by mulching and irrigation. **Turrialba**, San José, v. 13, n. 2, p. 96-115, Apr./June 1963.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-Cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141–145, Jan. 1990.

CARLSON, R. F. Factors influencing root formation in hardwood cutting of fruit trees. **Quarterly Bulletin Michigan Agricultural Experimental Station**, East Lansing, v. 48, n. 3, p. 449-454, 1966.

- CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arábica. **Separata dos boletins da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, n. 226-230, 1946.
- CARVALHO, G. R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica*) propagadas “in vitro”**. 1997. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.
- CARVALHO, M. **Comportamento em pós plantio de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) propagados vegetativamente**. 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.
- CASTRO, F. S. DE; Districion de la raíces del cafeto (*Coffea arabica*) em suelo de El Salvador. **El Café de El Salvador**, El Salvador, v. 30, n 344-345, 1960.
- CATUNDA, P. H. A. **Aclimatização de plântulas micropropagadas**. 2004. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CHEFFINS, N. J.; HOWARD, B. H. Carbohydrate changes in leafless winter apple cuttings. I The influence of level and duration of bottom heat. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 57, n. 1, p. 1-8, Jan. 1982.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 110 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- COUVILLON, G. A.; EREZ, A. Rooting survival and development of several peach cultivars propagated from semi hardwood cuttings. **Hortiscience**, Alexandria, v. 15, n. 1, p. 41-43, Feb 1980.
- 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. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1980. p. 586-596.
- DaMATTA F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 1-16, Jan./Apr. 2004.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-

cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 120, n. 3, p. 435-440, May 1995.

DE PENA, M. Somatic embryos 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.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, In Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1997.

DUBLIN, P. Multiplication vegetative in vitro de l'arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 24, n. 4, p. 281-290, oct./dic. 1980.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAEMG. **Diagnóstico da cafeicultura em Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1986. 52 p.

FRANCO, C. M.; INFORMAZO, R. O. Sistema radicular do cafeeiro nos principais tipos de solo no estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 6, n. 9, p. 443-478, set. 1946.

GARRIZ, P. I. Distribución radicular de três cultivares de *Coffea arabica* de 24 años de edad, em un suelo limo-arcilloso. **Ciencia de la Agricultura**, v.2, p. 65-76, 1978.

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

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 99-160.

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Transplantin of cauliflower plants Regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to Changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edingurgh, v. 17, n. 1, p. 1-7, 1977.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília –DF: Embrapa-CNPq, 1999. v. 2.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; SOUZA, C. A. S. **Cafeicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 317 p.

GUISCAFRE, A. J.; GOMÉZ, L. A. Studies of the root system of *Coffea arabica*, part I: environment condition affecting the distribution of coffee root in Colosso Clay. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Río Piedras, v. 22, n. 1, p. 34-39, 1942.

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

HICKS, G. S. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical Study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 9, p. 1913-1920, Sept. 1987.

HUXLEY, P. A.; PATEL, R. Z.; KABAARA, A. M.; MITCHELL, H. W. Tracer studies with ³²P on the distribution of functional roots of arabica coffee in Kenya. **Annals of applied biology**, Cambridge, v. 77, n. 2, p. 159-180, June 1974.

HUXLEY, P. A.; TURK, A. Preliminary investigations with arabica coffee in a root observation laboratory in Kenya. **Kenya Coffee**, Nairobi, v. 41, p. 349-360, 1976.

INFORZARO, R.; REIS, A. J. Desenvolvimento do sistema radicular em diversas fases do crescimento do cafeeiro. Campinas: IAC, 1974. 13 p. (IAC. Circular, 40).

LANAUD, C. Production de plantules de *C. canephora* par embryogénese somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 25, n. 4, p. 231-236, oct./dec. 1981.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Prunus communis* L.) cv. Batlrrt e do clone OH x 97**. 1995. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

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

MARTINS, A. B. G. **Uso de reguladores de crescimento no enraizamento de estacas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.).** 1985. 23 p. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento-SARC/PROCAFÉ, 2005. 434 p.

MATIELLO, J. B.; SOUZA DANTAS, F. A. Desenvolvimento do cafeeiro e do seu sistema radicular com e sem irrigação, em Brejão PE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 14., 1987, Campinas. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC, 1987. p. 165-166.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Genética e melhoramento do cafeeiro.** Lavras: UFLA, 1998. 99 p.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Cultivo in vitro de três espécies do gênero *Passiflora*.** 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola superior de agricultura luiz de Queiroz, Piracicaba.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. B.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out. 2001.

NICK, J. A.; YORINORO, G. T.; VARGAS MOTTA, A. C.; SCOPEL, I.; CUNHA FERNANDES, J. S. Efeito de 11 anos de cultivo de café sobre parâmetros químicos do solo e crescimento de raiz, no município de Tomazina, PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 20., 1994, Guarapari. **Anais...** Rio de Janeiro: MAARA/Procafé, 1994. p. 131-132.

NUTMAN, F. J.; The root system of *Coffea arabica* – I: root system in typical soils of British East Africa. **Empire journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 1, p. 271-284, 1933.

PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. v. 1, p. 71.

PEREIRA, A. R. . **Embriogênese Somática direta em *Coffea arabica* L. Acaiaí Cerrado**. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PUERSON, E. S.; VAN LAMMENRN, A.; 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.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 13-66.

REZENDE, J. C. **Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de embriogênese somática direta**. 2005. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

RIBEIRO, L. S. **Cultura in vitro de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RODRIGUES, V. V.; TAYLOR, H. M. **Principles of soil plant interrelationship**. New York: McGraw-Hill, 1989. 275 p.

SAIZ DEL RIO, J. F.; FERNANDEZ, C. E.; BELAVITA, O. Distribution of absorbing capacity of coffee roots determined by radioactive tracers. **Proceedings of the American Society for Agriculture Science**, Beltsville, v. 77, p. 240-244, June 1961.

SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. Propagation *in vitro* del café. In: ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba, 1991. p. 621-642.

SÖNDAHL, M. R.; SÖNDAHL, C. N.; GANÇALVES, W. : Custo comparativos de diferentes técnicas de clonagem. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina PR. **Proceedings...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p. 59-65.

SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; MEDINA – FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. R. Coffee. In: AMMYRATO MCMILLEN. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York, 1984. p. 564-590.

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. 5, p. 395-408, 1977.

SONDAHL, M. R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogenese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 6., 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1978. p. 67.

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 culture tissue of coffea. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal *in vitro* culture. **Journal of the American Society Horticulture Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1988.

SUTTER, E. G.; LUZA, J. Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* 'M-26' shoots grown in vitro. **International Journal of Plant Botany**, Chicago, v. 154, n. 1, p. 59-67, Mar. 1993.

TEIXEIRA, J. B.; PEREIRA, A. J. P.; JUNQUEIRA, C. S.; MELLO, R. L. S.; SILVA, A. P. D.; MUNDIM, D. A. Obtenção de mudas clonais de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DE CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...**Londrina- PR: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2005.

TRENCH, A. D. Preliminary observations on coffee rotos in Kenya. Nairobi: Department of Agriculture of Kenya, 1934.

WELLMAN, F. L. **Coffee**: botany, cultivation, and utilization. Lodon: Leonard Hill, 1961. 488 p.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal Botany**, New York, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, Oct. 1982.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta horticulturae**, Wageningen, n. 120, p. 217-222, 1981.

Capítulo 2

Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática em diferentes níveis de água no solo

1 RESUMO

ALMEIDA, Gustavo Rennó Reis. **Comportamento de cafeeiros propagados via embriogênese somática em diferentes níveis de água no solo.** 2007. p. 21-39. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A propagação vegetativa do cafeeiro via embriogênese somática (ES) é uma ferramenta auxiliar muito importante em programas de melhoramento genético, pois permite a multiplicação de híbridos e de genótipos segregantes de alto valor agrônomo e possibilita reduzir, consideravelmente, o tempo necessário para o lançamento de novas cultivares. Todavia, existem poucos estudos sobre o comportamento de plantas obtidas por ES sob condições de baixa disponibilidade de água no solo. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes níveis de água disponível no solo em cafeeiros propagados via embriogênese somática, em comparação com cafeeiros propagados por sementes. Instalou-se um ensaio, em casa de vegetação, em esquema fatorial 4x2, sendo quatro níveis de água disponível no solo (40%, 70%, 100% e 130% da capacidade de campo) e dois métodos de propagação (embriogênese somática e semente), utilizando-se mudas de seis meses de idade da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44. Foram avaliados a massa seca das folhas, do caule e das raízes, a área foliar, a altura, o diâmetro do caule, o comprimento radicular, os números de ramos plagiotrópicos e o número de nós do ramo ortotrópico. Concluiu-se que tanto as plantas propagadas por embriogênese somática quanto as por semente apresentam desenvolvimento semelhante em condições de baixa disponibilidade de água no solo, e que o sistema radicular de cafeeiros propagados via embriogênese somática não limita, e pode até colaborar, para um maior desenvolvimento das plantas na fase inicial da cultura.

* Comitê Orientador: Rubens José Guimarães – UFLA (Orientador)

2 ABSTRACT

ALMEIDA, Gustavo Rennó Reis. **Performance of Somatic embryogenesis propagated coffee plants under different levels of soil water.** 2007. p. 21-39. Dissertation (Master in Agronomy/ Crop Science) – University Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Coffee micropropagation allows the multiplication of hybrids and segregating genotypes, and reduces from 30 to nearly 10 years, the time required to obtain new coffee cultivars. However, this technique is not yet ready for *Coffea arabica* L. large scale propagation and the field performance of plants produced through this process is not well known. This work aimed to study the behavior of plants propagated by indirect somatic embryogenesis. Two assays were carried out to compare vegetative propagated plants with seed derived plants. The first one studied radicular system morphology and plant response to water restraint and water excess. The second one was conducted in field conditions to evaluate the post-planting vegetative growth. In the greenhouse assay the vegetative propagated plants had higher vegetative growth than seed propagated plants in the following parameters: leaf and stem dry weight, plant height and number of orthotropic branches. There was no difference between the two propagation methods for the response to water stress. In the field trial the vegetative propagated plants showed higher vegetative growth during the first seven months for all the parameters evaluated. It was concluded that somatic embryogenesis propagated plants have better vegetative growth during the first seven months in the field and a similar response to plants obtained from seeds in water deficiency and water excess conditions.

* Guidance Committee: Rubens José Guimarães – UFLA (Adviser)

3 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa é uma importante ferramenta auxiliar para o melhoramento genético do cafeeiro, pois permite o desenvolvimento de cultivares clonais. Estas apresentam características idênticas as da planta matriz, partindo-se de um explante que consiste, na maioria das vezes, em tecidos foliares, para o caso em propagação via embriogênese somática e estacas do ramo ortotrópico, para o caso de propagação por estaquia, que é muito usada para a propagação de *Coffea canephora*.

Estudos realizados por Nutman (1933) caracterizaram de forma morfológica o sistema radicular do cafeeiro produzido a partir de sementes. Este autor constatou que, na maioria das vezes, este sistema consiste de uma raiz pivotante, freqüentemente múltipla, a maioria emite várias outras raízes, uma dando origem às outras (raízes axiais, verticais, laterais e absorventes). Plantas propagadas vegetativamente não se enquadram nesta descrição, pois se observa a ausência de predominância da raiz pivotante, existindo raízes laterais e axiais partindo do colo da planta, desenvolvendo e prevalecendo em grande quantidade da parte superficial do solo.

O sistema radicular diferente de plantas provenientes de propagação vegetativa suscita dúvidas sobre o comportamento destas plantas em condições adversas no campo, principalmente em condições de déficit hídrico. Sabe-se que raízes mais profundas no solo captam melhor água, em que a disponibilidade é maior. Raízes superficiais ficam sujeitas à desidratação, devido a períodos de secas severos e prolongados, chegando a ocasionar até a morte, principalmente de raízes mais finas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes níveis de água disponível no solo em cafeeiros propagados via embriogênese somática, em comparação a cafeeiros propagados por sementes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação na Fazenda Experimental de Varginha do MAPA/Fundação Procafé, no período de maio a setembro de 2006. Foram utilizados vasos plásticos com a capacidade de 11 litros e, em cada um deles, foram colocados nove litros de substrato padrão para a produção de mudas de cafeeiro (Guimarães et al., 1999). No fundo dos vasos foram colocados um litro de brita nº. 2 e um litro de areia fina para facilitar a drenagem, que era feita por uma mangueira inserida no fundo de cada vaso. As mangueiras foram conectadas a recipientes plásticos, dos quais a água drenada era armazenada para que, na ocasião da próxima reposição de água, essa fosse utilizada, evitando-se perdas de nutrientes lixiviados.

Depois de instalado o experimento nas bancadas da casa de vegetação, os vasos com as plantas foram constantemente irrigados de forma homogênea, durante 30 dias, para facilitar o “pegamento” das mudas. Teve-se o cuidado de se reaproveitar a água drenada nas reposições seguintes.

Após o “pegamento das mudas”, o ensaio foi instalado em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial de 4x2, sendo quatro níveis de reposição de água (40%, 70%, 100% e 130% da água disponível no solo) e dois tipos de propagação da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 (via embriogênese somática e via semente). O experimento foi instalado utilizando-se três vasos por parcela, e cada vaso possuía uma planta. Foram utilizadas quatro repetições, perfazendo um total de 32 parcelas e 96 plantas. O turno de rega foi feito a cada três dias, para a reposição de água nos vasos, durante três meses.

Para se calcular a quantidade de água que deveria ser repostada, foram distribuídos, nas bancadas, dois vasos por repetição (denominados vasos teste), a fim de se determinar a quantidade de água necessária para atingir 100% de água disponível no solo. Mesmo se tratando de um ensaio conduzido em casa de

vegetação, as condições internas do ambiente não eram homogêneas, necessitando, portanto, de cálculo da quantidade de água a ser repostada por repetição (vasos teste). O cálculo da quantidade de água necessária para 100% da água disponível por repetição foi feito colocando-se a cada turno de rega, nos vasos teste, uma quantidade conhecida de água para, após quatro horas (tempo suficiente para drenagem da água não retida no solo), medir-se a quantidade drenada para cálculo da quantidade de água que ficou retida no solo, sendo este valor o correspondente ao tratamento com 100%. Tendo-se este valor, calculava-se proporcionalmente aos tratamentos 40%, 70% e 130% (Adaptado de Oliveira, 2003).

As plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 propagadas via embriogênese somática indireta foram cedidas, ainda *in vitro*, pelo Dr. João Batista Teixeira, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As plântulas foram transplantadas para saquinhos plásticos com dimensões de 11 x 20cm, preenchidos, nos dois terços inferiores, com substrato padrão, para a produção de mudas (Guimarães et al., 1999) e no terço superior com areia de rio, favorecendo o desenvolvimento inicial das raízes. Após esta etapa, as plântulas, já no saquinho, foram levadas para casa de vegetação com circulação forçada de ar, com umidade relativa do ar de 100% e temperatura de 23°C, permanecendo neste local durante 30 dias. A seguir, as mudas foram colocadas sob sombrite 50%, por um período de 15 dias e, depois, por mais 15 dias a pleno sol, sendo, posteriormente, levadas a campo.

As plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 propagadas via semente foram adquiridas na Fazenda Experimental da Epamig da cidade de Machado, MG, onde foram selecionadas com a preocupação de estarem com o mesmo porte das plantas propagadas via embriogênese somáticas indireta.

Na avaliação do ensaio, foram feitas apenas avaliações finais destrutivas das plantas de cafeeiros, após três meses de aplicação dos tratamentos.

Avaliaram-se a massa seca de folhas (MSF), a massa seca de caules (MSC) e a massa seca de raízes (MSR), utilizando-se uma balança de precisão (gramas). A área foliar (ARF) foi avaliada multiplicando-se o comprimento (cm) pela maior largura (cm) de todas as folhas e, em seguida, multiplicando-se pelo fator de correção para café arábica de 0,667 (Gomide et al., 1977). A altura das plantas (ALT) foi medida com uma régua graduada (cm), a partir do colo da planta até o meristema apical. Para o diâmetro do caule (DCA), usou-se um paquímetro (mm) na altura do colo. O comprimento radicular (COR) foi medido, com uma régua graduada (cm), do colo das plantas até o término da raiz mais longa. Foram avaliados também o número ramos plagiotrópicos primários (NRP), tomados a partir do primeiro nó do ramo ortotrópico e o número de nós do ramo ortotrópico (NNO), contando-se a partir da colo até o ápice da planta.

Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância por meio do programa estatístico Sisvar versão 4.3 (Ferreira, 2000). Houve transformação de dados para MSF, sendo utilizada transformação de raiz quadrada e, para as variáveis respostas ARF e NRP, transformação logarítmica. Para as variáveis significativas pelo teste de F, foi utilizado o teste de Scott Knott. Os dados que apresentaram diferença significativa para os níveis de reposição de água foram submetidos a regressões.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas interações significativas entre o método de propagação e os níveis de reposição de água para nenhuma das características avaliadas (Tabela 1).

Ao avaliar o efeito isolado dos métodos de propagação e dos níveis de reposição de água no solo, foram encontradas diferenças significativas, pelo teste de F, a 1% e 5% de probabilidade (Tabela 1), para: a) massa seca de folhas, tanto entre tipos de propagação (embriogênese somática e sementes) quanto para níveis de reposição de água; b) massa seca de caule, houve diferença significativa apenas para os métodos de propagação; c) área foliar, houve efeito significativo apenas para os níveis de reposição de água; d) altura, houve efeito significativo, tanto entre tipos de propagação quanto para níveis de reposição de água; e) número de ramos plagiotrópicos, houve efeito significativo apenas para os níveis de reposição de água; f) o número de nós no ramo ortotrópico, houve efeito significativo apenas para métodos de propagação.

Plantas propagadas via embriogênese somática apresentam um sistema radicular diferente de plantas propagadas via sementes. Nutman (1933) descreve o sistema radicular do cafeeiro propagado por sementes, denominando-o de raiz pivotante a raiz curta e grossa, freqüentemente múltipla, terminando abruptamente e raramente estendendo-se além de 45cm abaixo da superfície do solo. Para as plantas propagadas via embriogênese somática, observou-se ausência da raiz pivotante com predominância de raízes laterais com crescimento no sentido horizontal até cerca de 2-4 cm e, depois, com crescimento vertical descendente (Figura 1).

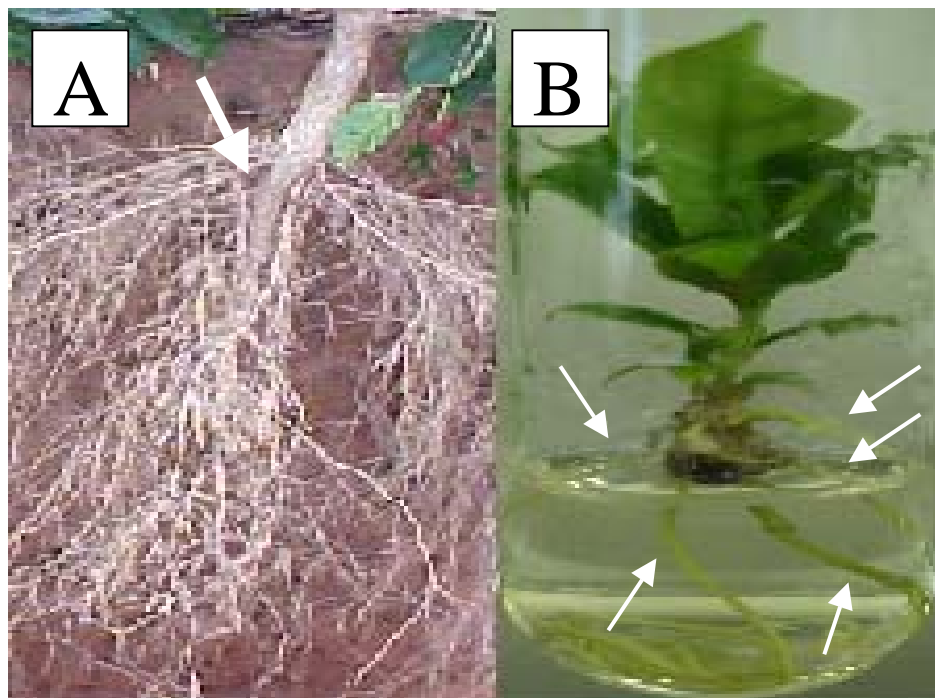


FIGURA 1. Sistema radicular de plantas propagadas por semente (A) e plantas propagadas por embriogênese somática (B).

Espera-se, de sistemas radiculares eficazes na busca de água e nutrientes, como o de plantas adaptadas à seca, que sejam frequentemente caracterizados como profundos e vigorosos (DaMatta, 2004). Outros autores afirmam que mudas de cafeeiros mal manejadas na operação de repicagem ou, até mesmo, no plantio, podem apresentar bifurcação da raiz principal, impedindo um bom desenvolvimento do sistema radicular e baixa exploração em profundidade, chegando ao extremo de levar a planta à morte na fase inicial ou logo na primeira produção, não suportando a carga pendente (Guimarães et al., 2002; Rena & Maestri, 1986). Há a preocupação de que plantas propagadas por embriogênese somática possam apresentar problemas de absorção da água e de

nutrientes, semelhante ao que ocorre com plantas com sistema radicular bifurcado.

Analisando-se o sistema radicular das plantas oriundas de embriogênese somática e de sementes, constata-se, de acordo com a Tabela 1, que não houve diferença significativa (pelo teste de F, a 1% e a 5%) nem entre os métodos de propagação nem entre os níveis de reposição de água, quando se avaliaram a massa seca de raízes e o comprimento do sistema radicular. Tal resultado sustenta a hipótese de que os sistemas radiculares de plantas oriundas de embriogênese somática podem ser tão eficazes quanto o de plantas oriundas de sementes, concordando em parte, com os resultados de Carvalho (2005). Este autor afirma que as plantas oriundas de estacas (que possuem raízes morfológicamente semelhantes às de plantas obtidas por embriogênese somática quanto à forma) são mais vigorosas e com sistema radicular mais abundante. Também Partelli (2006), comparando plantas de *Coffea canephora* multiplicadas por sementes e por estacas, constatou não haver diferença no comprimento do sistema radicular entre os métodos de propagação. Deve-se considerar que plantas propagadas por estacas possuem sistema radicular diferente de plantas propagadas por sementes, com ausência de raiz pivotante e maior número de raízes laterais, à semelhança do que é observado em plantas propagadas via embriogênese somática.

Em relação às folhas dos cafeeiros, observa-se, segundo os dados da Tabela 1, que houve diferença significativa (pelo teste de F, a 5% de significância) entre as massas secas das folhas de plantas propagadas por embriogênese somática e sementes, porém, não houve diferença significativa entre esses métodos de propagação, nos resultados de área foliar (Tabela 1). O maior vigor das folhas das plantas oriundas de embriogênese somática pôde ser notado durante a condução do experimento, pois apresentavam uma coloração mais escura que plantas propagadas por semente. Carvalho (2005) obteve

resultado semelhante, ou seja, também constatou um maior vigor de plantas provenientes de propagação vegetativa, no caso estaquia. No referido trabalho, as plantas multiplicadas por estaquia apresentaram maior número de folhas que permaneceram nas plantas durante e após o período seco, confirmando um maior vigor nas folhas que o autor atribuiu ao fato de um sistema radicular mais desenvolvido.

Observa-se, pelo gráfico da Figura 2, os resultados de massa seca das folhas do cafeeiro no desdobramento para os níveis de reposição de água do solo, apresentando um aumento linear de acordo com o aumento do nível de reposição de água. A cada unidade (%) de disponibilidade de água no solo, a massa seca de folhas aumentou em 0,048 gramas.

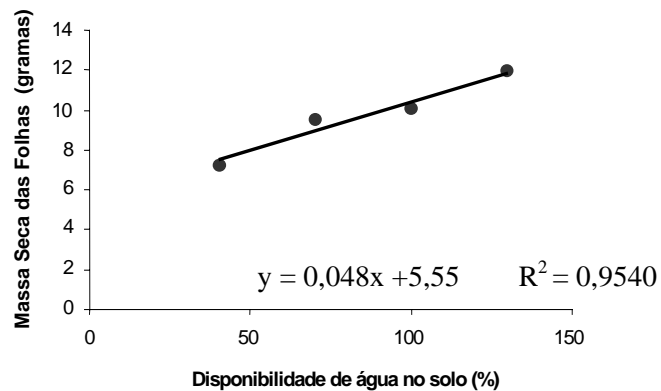


FIGURA 2. Massa seca das folhas de cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 propagadas por embriogênese somática e por semente em função de níveis de disponibilidade de água no solo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

TABELA 1. Resumo das análises de variância, coeficiente de variação e médias gerais para massa seca de folhas (MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca do sistema radicular (MSR), área foliar (ARF), altura (ALT), diâmetro de caule (DCA), comprimento da raiz (COR), número de ramos plagiotrópicos (NRP) e número de nós do ramo ortotrópico (NNO) do ensaio em casa de vegetação, para plantas propagadas via embriogênese somática e semente sob diferentes níveis de disponibilidade de água no solo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	G.l	Quadrado médio								
		MSR	COR	MSF ¹	ARF ²	MSC	DCA	ALT	NNO	NRP ²
Bloco	3	12,031**	10,301*	1,023**	0,10**	10,93**	0,0262*	104,95**	6,534**	0,032**
Propagação	1	0,1922	7,2962	0,3933*	0,013	4,812*	0,0034	434,09**	13,74**	0,0114
Níveis	3	0,6234	5,8969	0,792**	0,08**	1,5206	0,0093	28,324**	0,1329	0,036**
P*N	3	0,7920	2,6742	0,0175	0,0012	1,3612	0,0023	6,9579	0,2669	0,0076
Erro	21	0,9740	2,5186	0,0688	0,0065	0,6293	0,0047	4,0103	0,5092	0,0046
Total	31									
C.V (%)		20,77	5,50	8,53	2,65	18,91	10,29	7,09	6,70	9,74
Média Geral		4,75	28,83	3,08	3,04	4,19	0,67	28,25	10,65	5,33

¹ – Para a variável MSF, foi utilizada a transformação raiz quadrada.

² - Para as variáveis ARF e NRP, foi utilizada a transformação logarítmica.

(*) e (**) significativo, a 5% e 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

No gráfico da Figura 3, observa-se um aumento linear da área foliar de acordo com o aumento do nível de reposição de água no solo. A cada unidade (%) de umidade que se aumenta no solo, tanto para plantas propagadas via embriogênese somática quanto para as propagadas por semente, há um aumento médio de 6,81 cm² na área foliar das plantas.

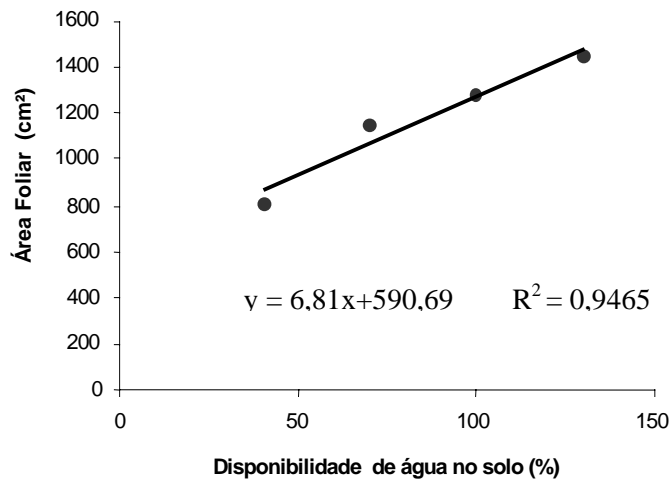


FIGURA 3. Área foliar (cm²) da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 propagada por embriogênese somática e por semente em função dos níveis de reposição de água no solo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Houve diferença significativa entre as massas secas de caules dos diferentes tipos de propagação (teste de F a 5%), tendo as plantas oriundas de embriogênese somática apresentado média de 3,19 gramas (Tabela 1), valor superior à média das plantas oriundas de sementes, com média de 2,97 gramas, ou seja, 6,9% menor. Para os níveis de reposição de água no solo, não houve diferença significativa pelo teste de F (Tabela 1), independentemente do método de propagação. Quanto à característica diâmetro de caule, não houve diferença significativa, para métodos de propagação nem para níveis de reposição de água,

possivelmente devido ao curto espaço de tempo, pois, tratando-se de diâmetro de caule, a variação é menor que as demais características ao longo do tempo.

Diferentemente do diâmetro de caule, a altura das plantas é alterada mais significativamente ao longo do tempo. Nota-se, pela Tabela 1, que houve diferença significativa de altura, tanto para os níveis de disponibilidade de água no solo quanto para os métodos de propagação. Na Figura 4, tem-se um aumento linear da altura de plantas, de acordo com a reposição de água no solo. A cada unidade (%) de umidade no solo aumentada, o cafeeiro cresceu, em altura, 0,047 cm. É comum, em trabalhos que visam a comparação entre diferentes métodos de propagação de plantas, a aplicação de diferentes níveis de reposição de água, como o utilizado por Oliveira (2003), que comparou plantas enxertadas com plantas de pé-franco, utilizando níveis de disponibilidade de água no solo parecidos ao deste trabalho.

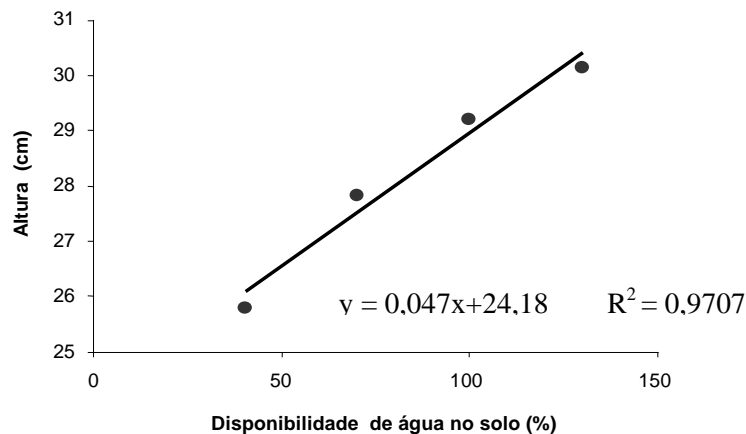


FIGURA 4. Altura de plantas da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 propagada por embriogênese somática e por sementes, em função de diferentes níveis de disponibilidade de água no solo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

O método de propagação que apresentou melhor desenvolvimento em altura de plantas foi a embriogênese somática, com 31,94 cm, diferindo da propagação via semente, que obteve 24,57 cm, ou seja, um valor 23,07% menor. Ao avaliar vários tratamentos comparando plantas provenientes de estacas e sementes, Carvalho (2005) concluiu que plantas formadas por estacas aos 19 meses após o plantio obtiveram a maior altura, concordando com os resultados do presente trabalho. Este mesmo autor constatou que plantas propagadas vegetativamente apresentam maior altura durante a fase inicial de crescimento.

Cafeeiros oriundos de embriogênese somática (Tabela 1) apresentaram maior número de nós do ramo ortotrópico (11,31 nós) em relação aos oriundos de propagação por sementes (9,99 nós), correspondendo a 11,67% de superioridade (Teste de F, a 1% de probabilidade). Esse resultado pode ser indicativo de maiores produtividades iniciais, visto que, se mantida a superioridade dessa característica durante o crescimento das plantas, serão aumentados também o número de plagiotrópicos e, conseqüentemente, a produtividade. Resultado semelhante foi obtido na avaliação da altura das plantas e na massa seca de caule.

Mesmo com o número nós dos ramos ortotrópicos apresentando diferenças significativas, o número de ramos plagiotrópicos entre as plantas propagadas por embriogênese somática e sementes não foi significativamente diferente (Tabela 1). Possivelmente, o curto espaço de tempo de experimentação contribuiu para a semelhança entre os resultados.

Veneziano et al. (2003) constataram correlação significativa entre altura de planta, número de ramos plagiotrópicos e produção. Quanto maior for o número de nós no ramo ortotrópico, maior será a emissão de ramos plagiotrópicos. No entanto, quando se comparam as plantas provenientes de propagação vegetativa e sementeira em *Coffea canephora*, não é somente a altura da planta o fator que determina o maior ou menor número de pares de

ramos plagiotrópicos. Nas mudas de cafeeiro formadas a partir de semente, a emissão dos primeiros ramos plagiotrópicos ocorre somente entre o 8º e 10º par de folhas verdadeiras. Por outro lado, nas plantas propagadas vegetativamente, a emissão dos ramos ocorre no início do seu desenvolvimento, pelo fato da muda ser formada a partir do tecido diferenciado fisiologicamente (Bragança et al., 2001). Esse comportamento é inerente ao método de propagação assexuada, que determina uma diminuição no período de juvenilidade das plantas, apresentando melhor desenvolvimento desde a fase jovem (Carvalho, 2005; Leopold & Kriedemann, 1978).

6 CONCLUSÕES

Plantas propagadas por embriogênese somática e por semente apresentam desenvolvimento semelhante em condições de baixa disponibilidade de água no solo.

O sistema radicular de cafeeiros propagados via embriogênese somática não limita, e pode até colaborar, um maior desenvolvimento das plantas na fase inicial da cultura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGANÇA, S. M.; CARVAHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café Conillon para o Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, maio 2001.

CARVALHO, M. **Comportamento em pós plantio de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) propagados vegetativamente**. 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

DaMATTA F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n. 1, p. p. 1-6, Jan./Apr. 2004.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: Sistema de análise de variância: versão 4. 0. Lavras. UFLA IDEX, 2000. (Disquete).

GOMIDE, M. G.; LEMOS, O. V.; TOURINO, D.; CARVALHO, M. M.; CARVALHO J. B.; DUARTE, C. S. Comparação entre métodos de determinação de área foliar em cafeeiros de mundo novo e catuaí. **Ciência prática**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 118-123, jul./dez. 1977.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G. **Produção de mudas de cafeeiro**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 60 p.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; SOUZA, C. A. S. **Cafeicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 317 p.

LEOPOLD, A. C.; KRIEDEMANN, P. E. **Plant growth and development**. New Delhii: Mcgraw-Hill, 1978. 545 p.

NUTMAN, F. J. The root system of *Coffea arabica* – I: root system in typical soils of Bristish East Africa. **Empire journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 1, p. 271-284, 1933.

OLIVEIRA, A. L. **Desenvolvimento de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) enxertados submetidos a diferentes níveis de reposição de água**. 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

PARTELLI, F. L.; VIEIRA, H. D.; SANTIAGO, A. R.; BARROSO, D. G. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café “Conilon” propagadas por estacas e por sementes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília DF, v. 41, n. 6, 9. 949-954, jun. 2006.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiología do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Pirtacicaba: POTAFOS, 1986. p. 13-66.

VENEZIANO, W.; FONSECA, A. F. A.; FAZUOLI, L. C. Avaliação de clones de café conilon em Rondônia . In : SIMPÓSIO DE PESQUISAS DE CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Consórcio Brasileiro de pesquisas e desenvolvimento do Café, 2003. p. 219.

Capítulo 3

**Comportamento, em condições de campo, de cafeeiros propagados via
embriogênese somática**

1 RESUMO

ALMEIDA, Gustavo Rennó Reis. **Comportamento, em condições de campo, de cafeeiros propagados via embriogênese somática.** 2007. p. 40-58. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A técnica da embriogênese somática indireta (ESI) do cafeeiro possibilita a multiplicação em larga escala de plantas matrizes superiores. Todavia, apesar de muito promissora, quase não se tem relato sobre o comportamento das plantas em condições de campo, gerando dúvidas sobre a sua viabilidade em condições comerciais. O objetivo do presente trabalho foi comparar o desenvolvimento de plantas propagadas via embriogênese somática com o de plantas propagadas por sementes, em condições de campo. Foi instalado um ensaio, a fim de avaliar o crescimento vegetativo da cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 propagada por ESI e por sementes e de um híbrido denominado de H427-3-4, também propagado por ESI. As avaliações foram realizadas sete meses após a implantação do experimento, na fase de desenvolvimento inicial das plantas. Plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 propagadas por embriogênese somática apresentaram maior crescimento vegetativo que aquelas propagadas por sementes e que o híbrido H427-3-4, diferenciando-se significativamente em todas as características morfológicas avaliadas. Concluiu-se que, no estabelecimento inicial no campo, plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 provenientes de ESI apresentam maior desenvolvimento que plantas provenientes de sementes e que o híbrido H427-3-4.

* Comitê Orientador: Rubens José Guimarães – UFLA (Orientador)

2 ABSTRACT

ALMEIDA, Gustavo Rennó Reis. **Field Performance of Somatic Embryogenesis Propagated Coffee Plants** 2007. p. 40-58. Dissertation (Master in Agronomy/ Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Amongst the various methods of vegetative propagation of coffee, the indirect somatic embryogenesis (ISE) technique is considered the most suitable because allows large scale multiplication of outstanding mother plants. However, although quite promising, there is very few information about field performance of ESI propagated plants, leading expectations about its commercial viability. This work aimed to compare the development of ISE propagated coffee plants with seed derived plants under field conditions. An experiment was conducted to evaluate the vegetative growth of the cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 propagated by ISE and by seeds and the hybrid H427-3-4, also propagated by ISE. The experiment was evaluated seven months after installation when the plants were 14 months old. ISE propagated plants of Catuaí Vermelho IAC 44 showed significant higher growth than those obtained by seeds and than the hybrid H427-3-4, for all the morphological trait evaluated. It was concluded that plants of the cultivar Catuaí Vermelho IAC 44 produced by ISE have better development than plants obtained by seeds and than plants of the H427-3-4 hybrid during the 14 months after planting.

* Guidance Committee: Rubens José Guimarães – UFLA (Adviser)

3 INTRODUÇÃO

Técnicas de clonagem em cafeeiros vêm sendo estudadas e praticadas ao longo dos anos. A intenção sempre foi o adiantamento do trabalho tradicional de melhoramento genético do cafeeiro que, por ser muito longo, acaba sendo oneroso. A técnica mais usada, atualmente, é a propagação por estaquia em cafeeiros da espécie *Coffea canephora*, a qual possui facilidade de propagação e grande volume de brotações, o que ajuda na aplicação desta técnica.

Em cafeeiros da espécie *Coffea arabica* L., ocorre dificuldade de aplicação dessa técnica por possuir pequeno número de brotações, que é bem menor quando comparado com *C. canephora*. Também o sucesso do melhoramento genético tradicional fez com que a técnica da propagação por estacas ficasse distante do café arábica.

A possibilidade de obter plantas de *C. arabica* que sejam estáveis nas características agronômicas desejáveis faz com que os trabalhos de melhoramento genético tradicionais e a biotecnologia avancem a cada dia. Um exemplo é a técnica de embriogênese somática indireta, pela qual cafeeiros do programa de melhoramento genético que ainda demoram a serem disponibilizados no mercado possam ser adiantados e maximizados em sua propagação, oferecendo a condição comercial de plantas clonadas em larga escala.

Apesar de a técnica ser muito promissora, quase não se tem relato sobre o comportamento destas plantas em condições de campo, gerando dúvidas sobre o manejo aplicado, a longevidade das plantas e as diferenças de plantas propagadas de forma convencional, ou seja, por sementes. O objetivo do presente trabalho foi comparar o crescimento, em campo, de plantas propagadas via embriogênese somática, com o de plantas propagadas por sementes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado, em condição de campo, na Fazenda Experimental de Varginha do MAPA/Fundação Procafé. As mudas de cafeeiro que compunham os tratamentos foram plantadas em campo no mês de janeiro de 2005.

Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados com parcelas subdivididas no tempo, avaliando-se o comportamento de três genótipos de cafeeiros em sete épocas de avaliação. Assim, as parcelas foram constituídas pelos três genótipos e as subparcelas de sete avaliações. Contou-se com dez repetições, sendo a parcela experimental constituída por sete plantas.

Os genótipos utilizados foram: a) Catuaí Vermelho IAC 44 propagado via embriogênese somática indireta; b) o uso do mesmo genótipo, mas propagado de forma tradicional, ou seja, via semente; c) um híbrido de cafeeiro denominado H 427-3-4, resultado do cruzamento Catuaí Vermelho IAC 44 (Controle da UFV: UFV 2144-260 EL 7) x Híbrido Timor CIFIC 2570 (Controle da UFV: VER 209-2= UFV 439-2) propagadas por via embriogênese somática indireta. Este híbrido, selecionado em Patrocínio, MG, foi cedido pelo pesquisador da Epamig Dr. Antônio Alves Pereira.

As plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 propagadas via embriogênese somática indireta, foram cedidas, ainda *in vitro*, pelo Dr. João Batista Teixeira, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF e foram aclimatadas em Varginha, MG.

O ensaio foi montado no campo no mês de janeiro de 2005 e as avaliações foram iniciadas seis meses após a implantação, no intuito de que todas as plantas tivessem uniformidade no campo, pois suas origens eram diferentes.

As plantas foram avaliadas mensalmente, durante um período de sete meses (junho de 2005 a janeiro de 2006), medindo-se: a) altura das plantas

(ALT), medida com uma régua graduada (cm), a partir do colo até o meristema apical; b) diâmetro do caule (DCA), com auxílio de um paquímetro (mm), na altura do colo; c) número de ramos plagiotrópicos primários (NRP), contados a partir do primeiro nó do ramo ortotrópico; d) número de nós do primeiro ramo plagiotrópico (NNP) e e) comprimento do primeiro ramo plagiotrópico (CPP), medido da inserção com o ramo ortotrópico até o meristema apical.

Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância, usando o software estatístico Sisvar versão 4.3 (Ferreira, 2000). Para a variável resposta “comprimento do primeiro ramo plagiotrópico”, houve transformação de dados (raiz quadrada). As variáveis que apresentaram diferença significativa, pelo teste de F, foram submetidas ao teste de Scott Knott e regressões.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa, na maioria dos resultados obtidos, para os genótipos testados e os períodos de avaliação (Tabela 1). Observou-se que, ao longo do tempo, as plantas dos cafeeiros Catuaí Vermelho IAC 44 propagados via embriogênese somática e via sementes e ainda o híbrido H 427-3-4, também propagados por embriogênese somática apresentaram comportamentos diferentes. Além de as interações entre genótipos e períodos de avaliação terem sido significativas, também encontraram-se diferenças significativas entre os genótipos, independentemente dos períodos de avaliação e entre os períodos, e dos genótipos testados, em todas as características avaliadas, pelo teste de F, a 1% de probabilidade (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo das análises de variância, coeficiente de variação e médias gerais para altura (ALT), diâmetro de caule (DCA), número de ramos plagiotrópicos (NRP), número de nós do primeiro ramo plagiotrópico (NNP) e comprimento do primeiro ramo plagiotrópico (CPP) para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Fonte de variação	G.l.	Quadrado médio				
		ALT (cm)	DCA (cm)	NRP	NNP	CPP(cm) ¹
Bloco	9	37,41	0,03	9,56	2,55	0,47
Genótipos	2	1.716,67**	1,93**	868,12**	256,2**	22,64**
Erro (1)	18	25,32	0,02	3,27	1,26	0,21
Período	6	3.906,32**	4,59**	915,7**	317,4**	62,24**
P*Período	12	9,8**	0,01	2,19**	0,68**	1,00**
Erro (2)	162	2,37	0,01	1,03	0,24	0,02
Total	209					
C.V ₁ (%)		16,28	16,02	15,92	19,52	11,80
C.V ₂ (%)		4,88	8,65	8,93	8,53	2,78
Média		30,91	0,95	11,35	5,76	3,87

¹- Para a variável CPP, foi utilizada a transformação raiz quadrada
 (**) significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

O valor médio para o resultado de altura de plantas, nas sete avaliações realizadas (sete meses), é apresentado na Tabela 2. Nota-se que houve diferença significativa no desdobramento da interação em todos os períodos avaliadas e entre os genótipos de plantas propagadas via embriogênese somática (Catuaí Vermelho IAC 44 e o híbrido H 427-3-4) e semente. O genótipo propagado via embriogênese somática Catuaí Vermelho IAC 44 foi o que apresentou maior desenvolvimento em altura (Figura 1). O híbrido H 427-3-4, também proveniente de embriogênese somática, apresentou um menor crescimento, provavelmente devido à metodologia usada durante o processo de propagação por embriogênese somática e genética de baixo porte (comunicação pessoal)*.

TABELA 2. Valores médios de altura de plantas (cm) para cafeeiros propagados por embriogênese somática e semente para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Genótipos	Meses após o plantio						
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
H 427-3-4 Embriogênese	13,13c	15,93c	19,04c	24,20c	29,73c	36,28c	40,77c
IAC 44 Semente	18,23b	21,35b	24,68b	29,94b	36,21b	43,45b	48,53b
IAC 44 Embriogênese	21,49a	23,8a	27,18a	33,21a	40,18a	48,12a	53,64a

Médias seguidas de mesma letra não diferem na coluna, para cada variável resposta, entre si pelo Teste de Scott Knot, a 5% de probabilidade.

Nota-se que, já na primeira avaliação (Tabela 2), o genótipo Catuaí Vermelho IAC 44 obtido por embriogênese somática, superava a obtida por semente em 15,17% e em 38,90% o híbrido H 427-3-4. Na última avaliação, o genótipo Catuaí Vermelho IAC 44 obtido por embriogênese, superava a obtida por semente em 9,53% e em 23,99% H 427-3-4, mantendo uma diferença significativa durante todo o período de avaliação (Tabela 2).

* Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, D.Sc., (Embrapa Café) 2007.

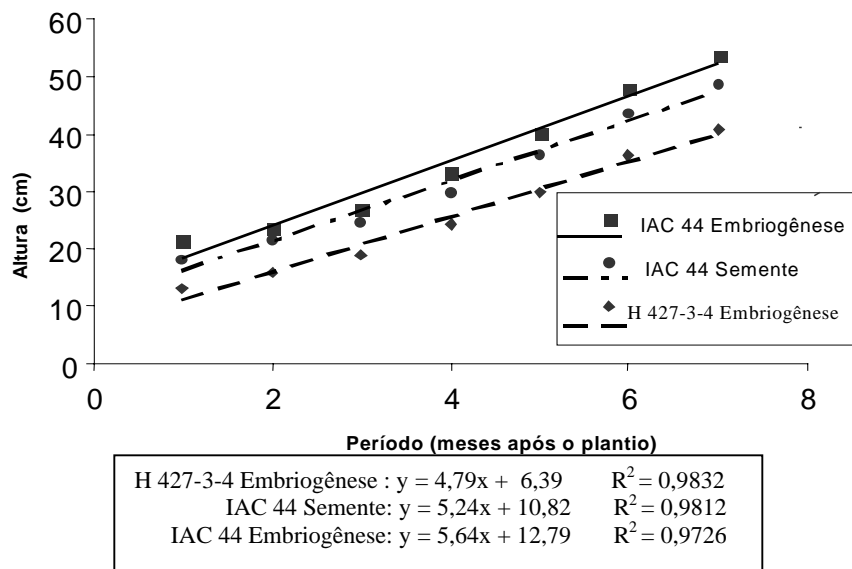


FIGURA 1. Altura média de plantas (cm) de mudas de café propagadas por embriogênese somática e semente, para três genótipos de cafeeiros. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Richie et al. (1993) compararam o crescimento de plantas de pinheiro propagadas por estaquia e semente, das quais a primeira possui sistema radicular diferente, com raízes adventícias em vez de raiz pivotante, à semelhança do que é observado com plantas provenientes de embriogênese somática. Os autores verificaram que aquelas propagadas por estaquia tiveram maior altura das plantas e maior volume do sistema radicular do que plantas propagadas por sementes. Contudo, depois de dois anos no campo, não houve relação entre o número de raízes e o crescimento em altura.

No presente trabalho, também os resultados indicaram que na fase inicial de desenvolvimento do cafeeiro, a altura de plantas é superior em todos os períodos avaliados. É possível que o sistema radicular seja também mais volumoso porque vários estudos têm mostrado relação positiva entre o sistema

radicular e o subsequente crescimento no pós-plantio, em cafeeiros e em outras culturas (Carvalho, 2005; Foster et al., 1985; Paul et al.; 1993; Pereira, 1991; Struve et al., 1984; Ying & Bagley, 1974).

Para diâmetro do caule (Tabela 3), houve variação significativa para os genótipos testados. As plantas de Catuaí Vermelho IAC 44 propagadas via embriogênese somática apresentaram maior diâmetro (1,12 cm), representando uma diferença superior de 16,07% sobre as plantas propagadas por semente e 29,46% das plantas do híbrido H 427-3-4. Ao longo do período experimental, também encontrou-se diferença significativa, sendo que a cada mês o diâmetro do caule aumentava 0,18 cm (Figura 2). A interação entre estes fatores (genótipos e período) teve expressão não significativa (Tabela 1), provavelmente pelo longo tempo necessário para o desenvolvimento do caule de cafeeiros.

TABELA 3. Valores médios de diâmetro de caule (cm) para cafeeiros propagados por embriogênese somática e semente para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Genótipos	Média
H 427-3-4 Embriogênese	0,79 c
IAC 44 Semente	0,94 b
IAC 44 Embriogênese	1,12 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Scott Knot, a 5% de probabilidade.

A maior emissão de ramos plagiotrópicos foi de Catuaí Vermelho IAC 44 propagada via embriogênese somática, destacando-se significativamente, a cada mês, da mesma cultivar propagada via semente que, por sua vez, também diferiu do híbrido H 427-3-4 propagado via embriogênese somática. Este último emitiu o menor número de ramos plagiotrópicos (Tabela 4 e Figura 3). Plantas que apresentam maior altura tendem a apresentar maior número de ramos plagiotrópicos, logo, com maior número de gemas, podendo influenciar de

maneira positiva na produção (Karasawa, 2001). Isto foi confirmado neste trabalho, em que os resultados demonstraram superioridade em altura ao final dos sete meses de avaliação para o genótipo Catuaí Vermelho IAC 44 propagado via embriogênese somática com 9,53%, sobre as plantas propagadas via semente. Para o número de ramos plagiotrópicos, a superioridade foi de 20,76% no mesmo período, confirmando a relação de altura com número de ramos plagiotrópicos. Dias (2002), avaliando o crescimento vegetativo e a produção de 25 cultivares de *Coffea arabica* L., verificou que plantas com maior incremento em altura tiveram maior produção, reafirmando a observação Karasawa (2001).

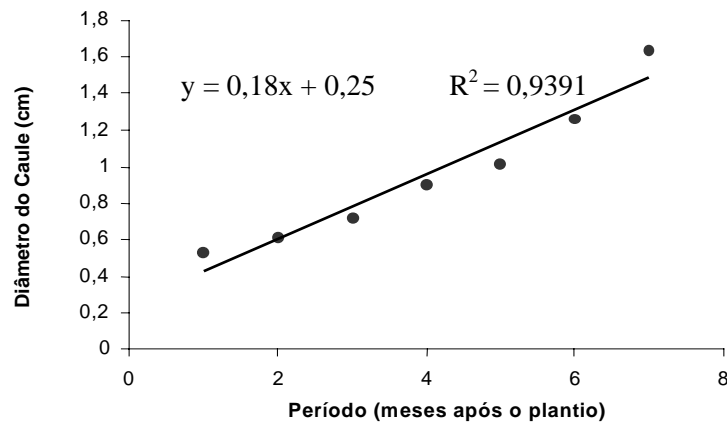


FIGURA 2. Diâmetro de caule (cm) de mudas de café propagadas por embriogênese somática e semente, para três genótipos de cafeeiros. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Verificou-se diferença significativa para o número de nós e comprimento do primeiro ramo plagiotrópico em todo o período avaliado (Figura 4 e 5), evidenciando o melhor desenvolvimento do primeiro ramo plagiotrópico para o genótipo Catuaí Vermelho IAC 44 propagado via embriogênese somática. Este mesmo genótipo apresentou, no primeiro mês de avaliação, uma superioridade de 60,78% no número de nós do ramo

plagiotrópico sobre a propagação por semente e 82,63% sobre o híbrido H 427-3-4 (Tabela 5 e 6). No final da avaliação (sétimo mês), esta superioridade diminuiu, mas ainda manteve diferença significativa, tendo a superioridade da IAC 44 propagado por embriogênese somática foi sido de 23,97%, sobre as plantas propagadas por semente e, sobre o híbrido H 427-3-4, de 29,43%. Esta superioridade pode estar relacionada a um maior volume do sistema radicular do genótipo Catuaí Vermelho IAC 44 propagada por embriogênese somática. Freitas et al. (2000) relacionaram um maior desenvolvimento da parte aérea da planta com um sistema radicular mais desenvolvido, o que possibilita o crescimento das raízes até os locais de maior umidade, mantendo uma melhor absorção de água no solo, mesmo durante o período sem precipitação. Segundo Jesus (2004), o sistema radicular de mudas de *Coffea arabica* cv Acaiá, provenientes de estacas sem o uso de qualquer indução para enraizamento, apresentou superioridade sobre as mudas obtidas por semeadura.

TABELA 4. Valores médios de números de ramos plagiotrópicos para cafeeiros propagados por embriogênese somática e semente para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Genótipos	Meses após o plantio						
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
H 427-3-4 Embriogênese	2,10 c	2,84 c	5,69 c	8,64 c	10,02 c	12,76 c	15,87 c
IAC 44 Semente	3,56 b	4,88 b	7,33 b	10,99 b	13,12 b	15,87 b	18,62 b
IAC 44 Embriogênese	7,92 a	9,07 a	11,82 a	15,49 a	17,90 a	20,85 a	23,5 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem na coluna, para cada variável resposta entre si, pelo Teste de Scott Knot, a 5% de probabilidade.

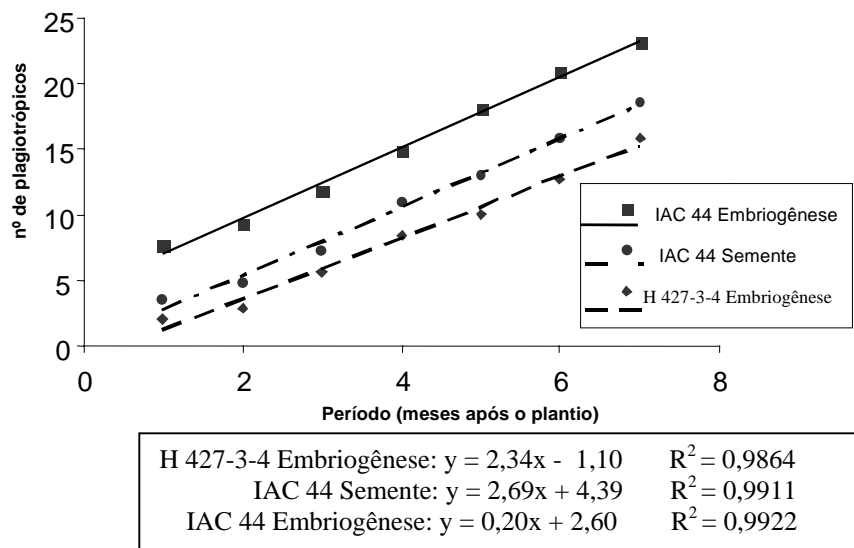


FIGURA 3. Números de ramos plagiotrópicos de mudas de café propagadas por embriogênese somática e semente para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Karasawa (2001) comenta que plantas que apresentam maior altura tendem a apresentar maior número de ramos plagiotrópicos, logo, com maior número de gemas, podendo influenciar de maneira positiva na produção. Assim, também o maior comprimento do primeiro ramo plagiotrópico e o número maior de nós observados nas plantas propagadas via embriogênese somática podem significar maiores produtividades das lavouras formadas com esse tipo de muda.

Ao final das avaliações no ensaio de campo, em de janeiro de 2006, houve um veranico de 21 dias e, posteriormente, um período de poucas chuvas, culminando com um déficit hídrico no solo de 298,2 mm, no dia 19 de setembro de 2006 (Fundação Procafé, 2007). Os cafeeiros propagados via embriogênese somática não apresentaram, visualmente, estresse hídrico, ao contrário de muitas plantas propagadas por semente, confirmando que seu sistema radicular diferenciado não é fator limitante para a manutenção destas plantas em campo.

TABELA 5. Valores médios de número de nós do primeiro ramo plagiotrópico para cafeeiros propagados por embriogênese somática e semente, para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Genótipos	Meses após o plantio						
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
H 427-3-4 Embriogênese	0,66 c	1,23 c	2,40 c	3,50 c	5,03 c	7,01 c	9,3 c
IAC 44 Semente	1,49 b	2,27 b	3,53 b	4,97 b	61,8 b	8,18 b	10,02 b
IAC 44 Embriogênese	3,80 a	4,46 a	5,84 a	7,59 a	9,03 a	11,25 a	13,18 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem na coluna, para cada variável resposta entre si, pelo Teste de Scott Knot, a 5% de probabilidade.

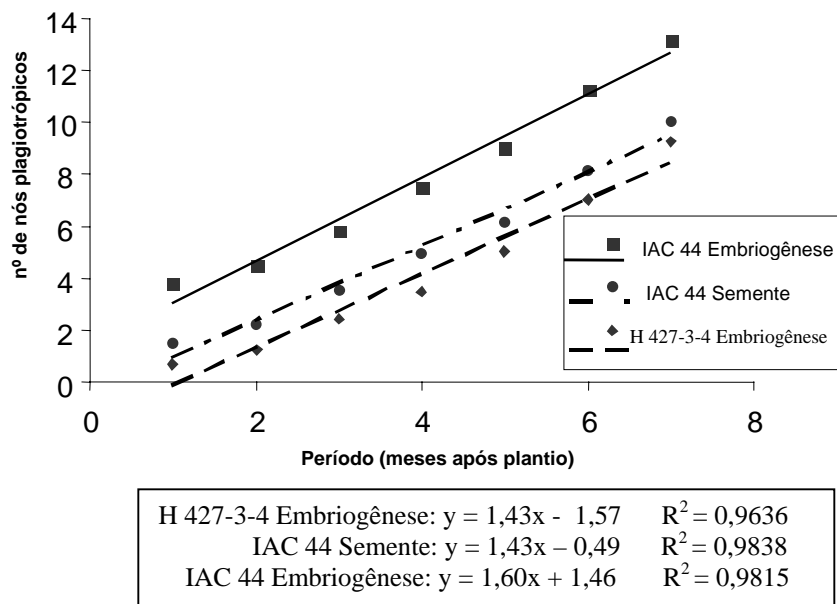


FIGURA 4. Número de nós do primeiro ramo plagiotrópico de mudas de café propagadas por embriogênese somática e semente para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

TABELA 6. Comprimento do primeiro ramo plagiotrópico (cm) para cafeeiros propagados por embriogênese somática e semente para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Genótipos	Meses após o plantio						
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
H 427-3-4 Embriogênese	1,58 c	2,67 c	6,62 c	12,14 b	18,63 b	26,09 b	31,55 c
IAC 44 Semente	3,70 b	4,99 b	8,18 b	13,00 b	18,80 b	27,03 b	33,30 b
IAC 44 Embriogênese	10,38a	11,34 a	14,69 a	19,51 a	24,80 a	32,17 a	38,17 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem na coluna para cada variável resposta entre si pelo Teste de Scott Knot, a 5% de probabilidade.

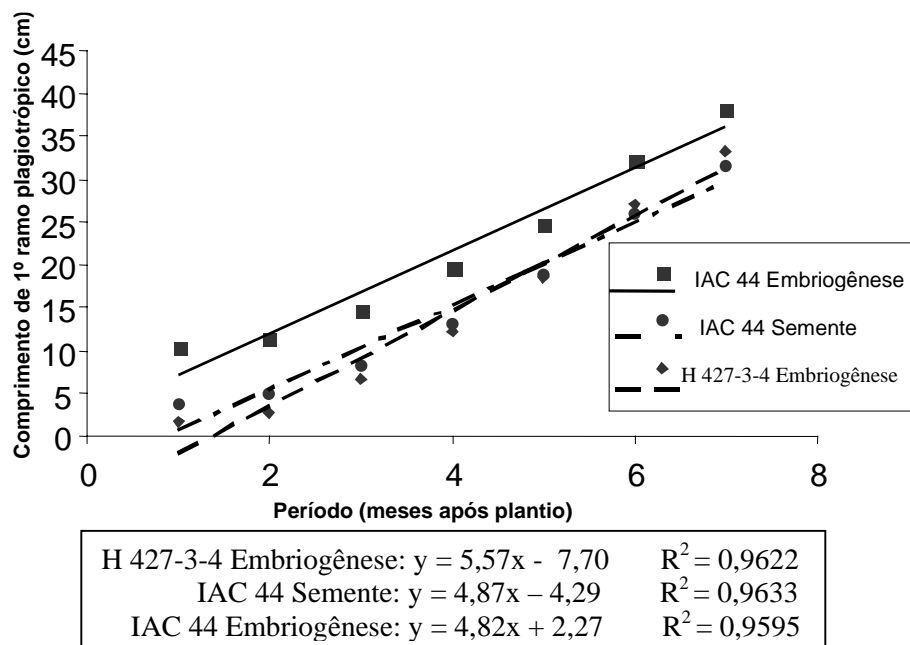


FIGURA 5. Comprimento do primeiro ramo plagiotrópico de mudas de café propagadas por embriogênese somática e semente, para três genótipos de cafeeiros obtidos do 7º ao 13º mês após o plantio. UFLA, Lavras, MG, 2007.

6 CONCLUSÃO

No estabelecimento inicial no campo, o genótipo Catuaí Vermelho IAC 44, proveniente de embriogênese somática, apresenta melhor desenvolvimento que o mesmo genótipo proveniente de sementes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, M. **Comportamento em pós plantio de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) propagados vegetativamente.** 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DIAS, F. P. **Caracterização de progênies de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) por meio de técnicas multivariadas.** 2002. 64 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR: Sistema de análise de variância: versão 4.0.** Lavras. UFLA IDEX, 2000. (Disquete).
- FOSTER, G. S.; CAMPBELL, R. K.; ADAMS, W. T. Clonal selection prospects in western hemlock combining rooting traits with juvenile height growth. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 12, n. 3, p. 488-493, Mar. 1985.
- FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, E. D.; SOARES, A. M.; FARIA, M. A.; DELÚ FILHO, N. Comportamento fisiológico de dois cultivares de *Coffea arabica* L. submetidos à duas condições de disponibilidade hídrica. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2000. p. 917-919.
- FUNDAÇÃO PROCAFÉ. **Estação de avisos fitossanitários.** Disponível em: <<http://www.fundacaoprocafe.com.br>>. Acesso em: 10 fev. 2007.
- JESUS, A. M. S. **Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** 2004. 170 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- KARASAWA, S. **Crescimento do cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Topázio MG – 1190) sob diferentes manejos de irrigação localizada.** 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PAUL, A. D.; FOSTER, G. S.; LESTER, D. T. Field performance, C effects, and their relationship to initial rooting ability for western hemlock clones.

Canadian Journal of Forest Research, Ottawa, v. 23, n. 9, p. 1947-1952, Sept. 1993.

PEREIRA, F. M. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) das cultivares 'Rica' e 'Paluma', em câmara de nebulização. **Científica**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 199-206, 1991.

RITCHIE, G. A.; TANAKA, Y.; MEADE, R.; DUKE, S. D. Field survival and early height growth of Douglas-fir rooted cuttings: relationship to stem diameter and root system quality. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 60, n. 3/4, p. 237-256, 1993.

STRUVE, D. K.; MCKEAND, S. E. Growth and development of eastern white pine rooted cuttings compared with seedlings through 8 years of age. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 20, n. 3, p. 365-368, Mar. 1984.

YING, C. C.; BAGLEY, W. T. **Genetic variation of eastern cottonwood**. Lincoln: University of Nebraska, Department of Forestry, 1974. (Progress Report, 1).