



EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM
Coffea arabica L.

ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL

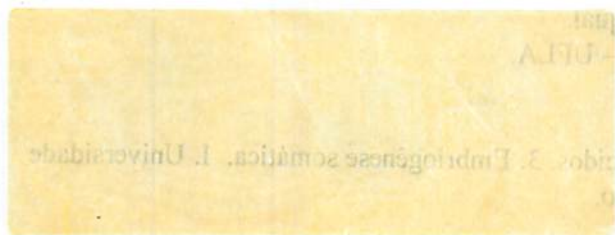
2001

ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM *Coffea arabica* L.

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

Orientador
Prof. Dr. Moacir Pasqual



**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

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

Maciel, Anna Lygia de Rezende

Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L. / Anna Lygia de Rezende
Maciel. -- Lavras : UFLA, 2001.

60 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Café. 2. Cultura de tecidos. 3. Embriogênese somática. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.733

ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM *Coffea arabica* L.

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

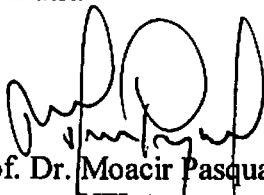
APROVADA em 30 de julho de 2001

Prof. Dr. Antonio Nazareno Guimarães Mendes

UFLA

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA



Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

A Deus, por me conceder a vida e guiar meu caminho.

A Nossa Senhora pelo conforto em todos os momentos.

AGRADEÇO

Aos meus pais Nívea e Célio Henrique,

Aos meus irmãos Tulio Marcos e João Paulo,

Às minhas sobrinhas Joana e Mariana,

com todo amor e gratidão.

DEDICO

Aos meus avós, Olga (*in memorian*) e Braz (*in memorian*),
pelos exemplos de vida que jamais serão esquecidos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo amor, compreensão e apoio durante toda minha vida.

À Universidade Federal de Lavras pela formação profissional.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento e Pesquisa do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Moacir Pasqual pela orientação, apoio, amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao professor Antonio Nazareno G. Mendes e ao pesquisador Leonardo Ferreira Dutra pela sugestões, amizade e participação na defesa de tese.

Ao pesquisador André Barretto Pereira e à Maria Aparecida (Cida) pela amizade, convivência e sugestões a este trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, Vantuil, Antônio Claret e Evaldo, pela amizade, companheirismo e auxílio na execução deste trabalho.

Aos amigos e colegas de curso, Lílian, Fábio, Graziela, Cristiane, Rafael, Edvan, Enoque, e em especial ao Adriano, pelo convívio e amizade.

Às amigas de república, Juliana e Nair, pela convivência e amizade infinita.

Aos amigos Janaína, Gabriela, Rupert e, em especial, a Alessandra e Rossana Dipe pela amizade inabalável.

Às bolsistas de Iniciação Científica Juliana e Alba pela amizade e apoio constante durante a execução deste trabalho.

A toda minha família.

Enfim, a todos que direta e indiretamente participaram da realização deste trabalho e da minha formação profissional.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	02
2.1 Aspectos gerais da cultura	02
2.2 Cultura de tecidos vegetais	03
2.3 Embriogênese somática	06
2.4 Cultivares de <i>C. arabica</i> L. resistentes à ferrugem.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Indução de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L.	16
3.1.1 Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos da cultivar Obatã	16
3.1.2 Concentrações de 2,4-D na indução de calos em diferentes cultivares.....	17
3.2 Diferenciação de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L.	18
3.2.1 Concentrações de BAP e 2,4-D na diferenciação de calos da cultivar Obatã	18
3.2.2 Concentrações de 2,4-D na diferenciação de calos em diferentes cultivares	19
3.3 Formação de embriões a partir de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L. ..	19
3.3.1 Concentrações de BAP e sacarose na formação de embriões a partir de calos da cultivar Obatã	20
3.3.2 Concentrações de BAP na formação de embriões a partir de calos em diferentes cultivares	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Indução de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L.	22

4.1.1	Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos da cultivar Obatã	22
4.1.2	Concentrações de 2,4-D na indução de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L.	27
4.2	Diferenciação de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L.	33
4.2.1	Concentrações de BAP e 2,4-D na diferenciação de calos da cultivar Obatã	33
4.2.2	Concentrações de 2,4-D na diferenciação de calos em diferentes cultivares	39
4.3	Formação de embriões a partir de calos em cultivares de <i>C. arabica</i> L. ..	44
4.3.1	Concentrações de BAP e sacarose na formação de embriões a partir de calos da cultivar Obatã	44
4.3.2	Concentrações de BAP na formação de embriões a partir de calos em diferentes cultivares	48
5	CONCLUSÕES	53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA: Ácido α -naftalenoacético

BAP: 6-benzilaminopurina

CIN: 6-furfurilaminopurina (cinetina)

GA₃: Ácido giberélico

MS: Meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962)

IC: Meio de cultura para indução de calos

D: Meio de cultura para diferenciação de calos

R: Meio de cultura para regeneração de calos

CC's: Calos cicatriciais

CPN's: Calos primários nodulares

CPM's: Calos primários mistos

CE's: Calos embriogênicos

CEF's: Calos embriogênicos friáveis

CF's: Calos friáveis

PMFC: Peso da matéria fresca de calos

NEG: Número de embriões globulares

NET: Número de embriões torpedos

NEC: Número de embriões cotiledonares

CV: Coeficiente de variação

R²: Coeficiente de determinação

RESUMO

MACIEL, Anna Lygia de Rezende. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** Lavras: UFLA, 2001. 60p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)*

Objetivou-se, com este trabalho, estudar a embriogênese somática indireta em cultivares de *Coffea arabica* L. resistentes à ferrugem, incluindo as etapas de indução, diferenciação, regeneração e formação de embriões. Indução de calos - Experimento 1: segmentos foliares retirados de plantas da cultivar Obatã, em condições de campo, foram desinfestados com álcool 70% por 1', hipoclorito de sódio 1% durante 15' e inoculados em meio IC suplementado de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L⁻¹) e cinetina (0, 2; 4 e 8 mg.L⁻¹). Experimento 2: Explantes foliares obtidos *in vitro* das cultivares Obatã, Katipó, Tupi e Catucaís Vermelho e Amarelo foram inoculados em meio de cultura IC suplementado de 2,4-D (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹) e cinetina (2 mg.L⁻¹). Diferenciação de calos - Experimento 1: calos primários mistos de Obatã foram transferidos para o meio DC adicionado de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L⁻¹) e BAP (0, 2, 4 e 8 mg.L⁻¹). Experimento 2: calos primários mistos das diferentes cultivares foram inoculados em meio DC contendo 2,4-D (0; 0,5; 1 e 2 mg.L⁻¹). Regeneração e formação de embriões - Experimento 1: calos embriogênicos friáveis foram inoculados em meio R suplementado de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹) e sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹). Experimento 2: calos embriogênicos foram transferidos para o meio R adicionado de BAP (0, 1, 2 e 4 mg.L⁻¹). Os meios de cultura tiveram pH ajustado para $5,6 \pm 1$ antes de serem autoclavados. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Durante as etapas de indução e diferenciação de calos, os experimentos ficaram em condições de obscuridade, e na etapa de regeneração, os experimentos foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas. Conclui-se que a combinação entre 2,4-D e cinetina favorece a indução de calos primários mistos. Os explantes foliares provenientes do campo induzem a formação de calos embriogênicos friáveis na presença de BAP (8 mg.L⁻¹) associado ou não ao 2,4-D e, conseqüentemente, maior número de embriões/explante, quando se utiliza sacarose (30 g.L⁻¹) e BAP (3 mg.L⁻¹). Os explantes oriundos de plantas *in vitro* favorecem a indução de calos embriogênicos nas cultivares Tupi e Catucaí Vermelho, em meio com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, e um número reduzido de embriões.

* Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador); Antônio Nazareno Guimarães Mendes – UFLA.

ABSTRACT

MACIEL, Anna Lygia de Rezende. **Indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L.** Lavras: UFLA, 2001. 60p. (Dissertation – Master of Science in Agronomy/Crop Science)*

It was aimed with this work to study the indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cultivars resistant to rust, including the steps of induction, differentiation, regeneration and formation of embryos. Callus induction - Experiment 1: leaf segments withdrawn from plants of 'Obatã' under field conditions were disinfected with 70% alcohol for 1', 1% sodium hypochlorite for 15' and inoculated in 'IC' medium supplemented with 2,4 D (0, 1, 2 and 4,0 mg.L⁻¹) and kinetin (0, 2, 4, and 8 mg.L⁻¹). Experiment 2: leaf explants obtained *in vitro* from 'Obatã', 'Katipó', 'Tupi' and 'Catucais Vermelho' and 'Amarelo' were inoculated in culture medium supplemented with 2,4-D (0, 2, 4 and 6 mg.L⁻¹) and kinetin (2mg.L⁻¹). Callus differentiation - Primary callus mixed of 'Obatã' were transferred to the 'DC' medium added with different 2,4-D (0, 1, 2 and 4 mg.L⁻¹) and BAP concentrations (0, 2, 4 and 8 mg.L⁻¹). Experiment 2: Primary callus from different cultivars were inoculated in 'DC' medium with 2,4-D (0; 0,5; 1 e 2 mg.L⁻¹). Embryo regeneration and formation - Experiment 1: friable embryogenic callus were inoculated into 'R' medium supplemented with BAP (0, 2, 4 and 6 mg.L⁻¹) and sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 mg.L⁻¹). Experiment 2: embryogenic callus were transferred to the 'R' medium added with BAP (0, 1, 2 and 4 mg.L⁻¹). The culture media utilized had their pH adjusted to 5,6 ±1 before they were autoclaved. The experiments were kept in a growth chamber at 26±1°C. Over the steps of callus induction and differentiation, the experiments were held under obscurity conditions and in the regeneration step the experiments were kept under 16-hour photoperiod. The combination between 2,4-D and kinetin favors the induction of mixed primary callus. Leaf explants from the field induce friable embryogenic callus formation with BAP (8 mg.L⁻¹) either associated or not with 2,4-D and hence, increased number of embryos/explant, when sucrose (30 mg.L⁻¹) and BAP (3 mg.L⁻¹) are utilized. The explants from *in vitro* plants support the induction of embryogenic callus in 'Tupi' and 'Catucais Vermelho' in a medium with 2 mg.L⁻¹ of 2,4-D and a reduced number of embryos.

* Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Major Professor); Antônio Nazareno Guimarães Mendes – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, detendo cerca de 18% do mercado e gerando aproximadamente 3 bilhões de dólares/ano para o país. Além do aspecto econômico, a cafeicultura apresenta relevante importância social como atividade geradora de empregos e fixadora da mão-de-obra no campo.

O melhoramento genético do cafeeiro através de métodos convencionais, principalmente hibridização, seguida da seleção de populações, avaliação de progênies, retrocruzamentos e cruzamentos interespecíficos, é um processo demorado, podendo levar mais de trinta anos para se obter uma nova cultivar (Almeida et al., 2000).

A clonagem representa uma alternativa vantajosa tanto do ponto de vista de pesquisa quanto comercial. A propagação vegetativa é indicada para a multiplicação de materiais genéticos de alta produtividade e resistentes a enfermidades, garantindo uniformidade nos povoamentos e mantendo o ganho genético obtido na seleção (Davide, Faria e Botelho, 1995). Por outro lado, a multiplicação assexuada do cafeeiro pelos métodos tradicionais se restringe à utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, em que o número é sempre limitado para um clone recentemente selecionado (Dublin, 1984).

As dificuldades de multiplicação podem ser minimizadas através da propagação vegetativa *in vitro*, possibilitando a seleção de material precoce, em larga escala e em curto espaço de tempo, sendo uma técnica importante para as culturas de ciclo longo. Esta técnica é vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas rápida e massivamente, visando a formação de plantios clonais.

A embriogênese somática em *Coffea* é um importante método de multiplicação de plantas elite *in vitro*, em larga escala, apresentando um grande potencial a ser explorado, capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético. Apresenta-se também como uma técnica conjunta aos trabalhos de transformação genética de plantas.

Objetivou-se, com este trabalho, estudar a embriogênese somática indireta em cultivares de *C. arabica* resistentes à ferrugem, incluindo as etapas de indução, diferenciação ou condicionamento, regeneração e formação de embriões.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Gerais da Cultura

A espécie *C. arabica* pertence à família Rubiaceae, originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, em uma região restrita e marginal às demais espécies. A faixa de altitude correspondente é entre 1000 e 2000 metros e algumas regiões limítrofes estão entre 8 a 12° latitude norte e 40 a 42° longitude leste de Greenwich (Charrier, 1978).

C. arabica é considerada uma espécie nobre, possuindo mais de 40 mutantes e muitas variedades. É tetraplóide, autofértil, ocorrendo 10 a 12% de fecundação cruzada. Apresenta raiz pivotante profunda e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem às folhas e também aos ramos plagiotrópicos, os quais dão origem às folhas e aos botões florais. As folhas apresentam coloração verde escura, são elípticas e apresentam 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 e Godoy Júnior, 1967).

A espécie *C. arabica* é a mais plantada em todo mundo, sendo de maior importância econômica para o Brasil, que está classificado como principal produtor, maior exportador e segundo consumidor de café do mundo. No país, aproximadamente dez milhões de trabalhadores se envolvem direta ou indiretamente com a cultura, em todos os segmentos do setor, desde a produção até sua comercialização e industrialização (Mendes, 1997).

O centro-sul é a principal região cafeeira do país. Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná somam mais de 90% da produção nacional de café. Minas Gerais participa de forma importante nesse cenário, destacando-se como maior produtor de café do Brasil, com cerca de 45 a 50% da produção nacional (Mendes, 1997).

O sul de Minas Gerais é a principal e mais tradicional região cafeeira do estado, com aproximadamente 50% da produção estadual e 34% da produção brasileira de café. A região compreende as áreas geográficas delimitadas pelos paralelos 12°12' a 22°10' de latitude e 44°20' a 47°20' de longitude, caracteriza-se também por áreas elevadas com altitude de 700 a 1080m, temperatura amena, sujeitas a geadas moderadas, deficiência hídrica e capazes de produzir um café de excelente qualidade de bebida (Ribeiro et al., 1998).

2.2 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais é considerada uma técnica de relevada importância, pois permite a propagação rápida, em curto espaço de tempo e em larga escala, de genótipos excepcionais obtidos através de programas de

melhoramento genético. É uma tecnologia adequada, principalmente, a culturas de ciclo longo, como o *C. arabica*.

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro no Brasil têm alcançado sucesso na obtenção de cultivares produtivas, elevando em cerca de 200% a produtividade das atuais cultivares em relação à primeira variedade plantada no Brasil. Porém, o tempo gasto e os recursos despendidos são fatores limitantes para melhoramento do cafeeiro através de métodos convencionais, uma vez que, nos últimos anos surgiram novos problemas como doenças, pragas, nematóides e maior exigência em qualidade pelo mercado consumidor (Mendes, 1997). Contudo, a multiplicação vegetativa *in vitro* surge como uma alternativa viável e a curto prazo para solução desses problemas.

Os trabalhos pioneiros com café, em cultura de tecidos, foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *C. canephora*. Posteriormente, diversos trabalhos envolvendo a espécie *C. arabica* foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a taxa de multiplicação, determinar o melhor meio de cultura e a relação ideal entre reguladores de crescimento (Bandel et al., 1975; Carvalho, Carvalho e Crócomo, 1974; Custer, Van e Buijs, 1980; De Pena, 1983; Owuor, 1987; Sondahl et al., 1984; Sondahl, Nakamura e Sharp, 1991; Thorpe e Patel, 1984; Andrade, 1998; Ribeiro, 2001).

Dublin (1980), Herman e Hass (1975) e Sondahl e Sharp (1977) desenvolveram vários trabalhos com propagação de variedades comerciais de café, regenerando plantas por neoformação de gemas, de entrenós verdes, de ramos plagiotrópicos, cultura de ápices meristemáticos e por indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam,

em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

O meio nutritivo deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato (normalmente a sacarose) e outras substâncias como vitaminas, aminoácidos, agente geleificante e reguladores de crescimento. Suco e polpa de frutas, leite de coco, extrato de leveduras (malte) e proteínas hidrolisadas são produtos que podem ser adicionados ao meio de cultura como alternativa para substituir vitaminas e aminoácidos ou mesmo como suplementos (Pasqual, 2001).

Diversas formulações de meio têm sido empregadas na cultura *in vitro*, as quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais. O meio de cultura básico MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais utilizado na propagação *in vitro* de *C. arabica*, promovendo resultados positivos na multiplicação de segmentos nodais, desenvolvimento de embriões e indução de embriogênese somática em explantes foliares (Cordeiro, 1999; Ribeiro, 2001).

A composição e concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento de explantes de *Coffea*.

As auxinas e as citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raízes, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento. Existem várias substâncias que pertencem a cada uma destas classes de reguladores e estas são utilizadas de acordo com o objetivo do trabalho (Skoog e Miller, 1957).

O cafeeiro, como outras espécies lenhosas, libera substâncias fenólicas; por esta razão, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como carvão ativado, polivinilpirrolidone (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (Andrade, 1998).

2.3 Embriogênese Somática

A embriogênese somática pode ser definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células haplóides ou somáticas diplóides, sem que haja a fusão de gametas. O embrião somático, que é morfológica e fisiologicamente similar ao embrião zigótico, tem o aspecto bipolar e apresenta sistema vascular fechado (Williams e Maheswaran, 1986).

A embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões (Sharp et al., 1980). A embriogênese somática direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos, e a embriogênese indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Guerra, Torres e Teixeira, 1999).

As células-mãe embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento das células embrionárias em divisão ativa, independente do padrão direto ou indireto. Estas características incluem o tamanho pequeno (100 - 200 μ m), conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e síntese de RNA (Tisserat, Esan e Murashige, 1979; Sharp et al., 1980; Vasil, 1982).

Os primeiros trabalhos conhecidos de embriogênese somática no gênero *Coffea* foram realizados por Starisky (1970), que obteve rápida proliferação de calos na espécie *C. arabica* e embriões e plântulas com explantes de *C. canephora*. Desde então têm-se desenvolvido pesquisas sobre a embriogênese

somática no gênero *Coffea* em diversos países (Hermann e Hass, 1975; Sondahl, 1978; Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983; Boxel e Berthouly, 1996; Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Cordeiro, 1999; Sreenath, 2000).

Em explantes foliares de café, pela via direta, os embriões somáticos originam-se, aparentemente de células embriogênicas pré-determinadas que requerem apenas um regulador de crescimento ou condições favoráveis (Williams e Maheswaran, 1986). No processo de embriogênese somática indireta, os embriões surgem de calos primários não diferenciados, que são formações de coloração marrom, globulares e mais ou menos compactas, situadas nos bordos dos explantes e contendo no máximo 20 embriões/explante. Surgem também de calos secundários embriogênicos friáveis, que originam cerca de 100 a 300 embriões/explante, quando cultivados em meio de cultura semi-sólido (Sondahl e Sharp, 1977).

Segundo Cordeiro (1999), a embriogênese somática em *Coffea* apresenta tipos distintos de calos durante a fase de indução. Os CPN's (calos primários nodulares) referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos freqüentes, na totalidade dos bordos dos explantes. Os CPM's (calos primários mistos), além da reação globular, apresentam formações amorfas de células alongadas com aspecto de algodão e se caracterizam pelo crescimento visivelmente mais rápido. Os CE's (calos embriogênicos) são calos primários contendo até 20 embriões/explante, e quando estes apresentam agregados celulares granulados, facilmente destacáveis e de coloração amarelo-creme, são então, caracterizados de CEF's (calos embriogênicos friáveis). Os calos embriogênicos e os calos embriogênicos friáveis correspondem, respectivamente, aos CEBF (calos embriogênicos de baixa freqüência) e CEAF (calos embriogênicos de alta freqüência). Os CEF's desprovidos de embriões são considerados CF's (calos friáveis).

Segundo Dublin (1991), o surgimento dos primeiros embriões, a taxa de embriogênese (porcentagem de explantes que produzem embriões) e o número de embriões produzidos por explante dependem de vários fatores, entre eles a origem e o tamanho do explante, a composição do meio de cultura e os reguladores de crescimento, o órgão fornecedor de explante, a idade, a época do ano em que é colhido e o genótipo da planta doadora.

A implementação da embriogênese somática ocorre a partir de explantes de origem diversa, como fragmentos de ramos ortotrópicos, ramos plagiotrópicos, folhas e tegumentos de óvulos, destacando-se as folhas por serem mais abundantes e de fácil desinfestação (Dublin, 1991).

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 como a multiplicação e crescimento de plântulas, são altamente dependentes da composição dos nutrientes minerais no meio de cultura (Monteiro-Hara, 2000).

A indução de embriogênese somática tem sido correlacionada com determinadas necessidades nutricionais; entretanto, poucos estudos têm sido dirigidos à análise do consumo dos componentes nutricionais (Dussert, Verdeil e Buffard-Morel, 1995), o que poderia levar a uma otimização do meio de cultura e, como consequência, a um melhor controle dos eventos embriogênicos. Preece (1995) mostrou que a otimização dos nutrientes salinos tornou possível a redução na concentração das substâncias reguladoras de crescimento. Em alguns casos, a combinação precisa entre o meio de cultura e o estágio fisiológico do explante pode até mesmo eliminar a necessidade de suplementação de substâncias reguladoras de crescimento, como é o caso da indução da cultura poliembriogenética do pinheiro-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*) a partir de explantes de pró-embriões zigóticos (Guerra, Torres e Teixeira, 1999) cultivados

em meio LP (von Arnolds e Eriksson, 1981). Magnaval et al. (1997) observaram relação positiva entre o conteúdo de cálcio, magnésio, potássio, amônio e cloreto em calos embriogênicos de *Cocos nucifera*.

Na embriogênese somática, normalmente são empregados pelo menos dois diferentes meios de cultura. O primeiro é otimizado visando à indução da embriogênese somática, enquanto o segundo meio permite o desenvolvimento dos embriões somáticos (Guerra, Torres e Teixeira, 1999).

A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais usada na embriogênese somática, embora outros mono e dissacarídeos possam ser utilizados. A concentração de sacarose influencia nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo em plantas é regulado por um grupo de genes (sacarose sintetase e sacarose invertase), cujas respostas são moduladas de acordo com a variação de sua concentração (Guerra, Torres e Teixeira, 1999). O número máximo de embriões formados em cultura de células de *Ranunculus* foi em meio de cultura com até 2% de sacarose; a concentração de 5% deste açúcar inibia ligeiramente este processo (Konar e Nakaraja, 1969). Matsuda, Kikiuta e Okazawa (1981) observaram que sacarose ou maltose foram os carboidratos mais efetivos na indução de embriogênese somática em cenoura, quando comparados com glicose, manose, rafinose e glicose + frutose.

As auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. Algumas espécies necessitam de meio de cultura suplementado com ácido giberélico ou ácido abscísico para o desenvolvimento de embriões somáticos, enquanto outras não precisam dessa suplementação, uma vez que o processo de indução foi estabelecido.

A embriogênese somática indireta requer a determinação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, dependendo da ação de reguladores de crescimento, não apenas para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação do

estado embriogênico (Sondahl, Nakamura e Sharp, 1985; Williams e Maheswaran, 1986). Contudo, duas estratégias têm sido utilizadas com o objetivo de obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira envolve o cultivo de explante sobre um único meio de cultura, suplementado apenas com citocinina (Yasuda et al., 1995), ou a combinação de auxina e citocinina (Pierson et al., 1983). A segunda estratégia utiliza o cultivo de explantes em um meio primário ou de indução, seguido da transferência dos explantes para o meio secundário, tido como de diferenciação (Dublin, 1984) ou de acondicionamento (Sondahl, Nakamura e Sharp, 1985), que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (Noriega e Sondahl, 1993; Sondahl, Nakamura e Sharp, 1985; Zamarripa et al., 1991).

Tecido embriogênico friável de *Coffea* tem sido isolado a partir dos dois tipos de cultivo de explantes foliares, em meio semi-sólido. No unifásico, o regulador de crescimento usado é apenas o BAP (Yasuda et al., 1985), enquanto no bifásico a reação calogênica primária inicia-se com a ação combinada de auxina/citocinina no meio de indução. No meio de diferenciação, a razão auxina/citocinina é reduzida (Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Noriega e Sondahl, 1993; Boxtel e Berthouly, 1996) ou substituída por apenas citocinina (Dublin, 1981; Zamarripa et al., 1991). Para ambas as etapas de isolamento e diferenciação de tecidos friáveis, tem-se verificado que a competência para a embriogênese somática indireta varia inter (Cordeiro, 1999 e Zamarripa, 1993) e intraespecificamente (Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse, Gofflot e Michaux-Ferriere, 1993), sugerindo que a maior expressão de competência genotípica para este método de propagação requer condições experimentais particulares (Santos et al., 2000).

Sharp et al. (1973), usando diferentes tipos de explantes de *C. arabica* cvs. Mundo Novo e Bourbon Amarelo em um meio semelhante ao de Staritsky (1970) acrescido de leite de coco a 5%, observaram um desenvolvimento

precoce de calos para altas concentrações de auxina (4 ou 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D). Por outro lado, Carvalho, Carvalho e Crócomo (1974) observaram que aumentando a concentração de sacarose para 40 g.L⁻¹ e caseína hidrolisada 2 g.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 2,4-D, houve a formação de calos no 13^o dia, quando incubados no escuro a 24°C. Herman e Hass (1975), utilizando o mesmo meio e 0,1 mg.L⁻¹ de cinetina e 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, observaram baixo crescimento de calos.

2.4 Cultivares de *C. arabica* L. resistentes à ferrugem

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, atualmente encontra-se presente nas principais regiões produtoras de café do mundo, causando elevados prejuízos à espécie *C. arabica*. Para a cafeicultura brasileira, se nenhuma medida de controle for adotada, a doença pode causar uma redução na produção da ordem de 30%. Apesar dos grandes avanços ocorridos no controle químico dessa doença, o uso de resistência genética ao patógeno constitui ainda a estratégia mais fácil e econômica para evitar ou diminuir os prejuízos que a *H. vastatrix* causa ao cafeeiro (Pereira e Sakiyama, 1999).

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), desde 1953, vem trabalhando nessa linha de pesquisa, introduzindo cafeeiros portadores de alelos que conferem resistência a *H. vastatrix* (Bettencourt e Carvalho, 1968). Várias hibridações foram realizadas com esses materiais visando a transferência desses alelos para populações de cafeeiros das cultivares de *C. arabica* (Carvalho e Mônaco, 1962). Do ponto de vista genético, observou-se o surgimento de novas raças do patógeno nas condições de cultivo no Brasil, anulando a resistência vertical encontrada em muitos desses materiais (Carvalho e Mônaco, 1971; Eskes, 1979), razão dos trabalhos se direcionarem mais para o estudo da

resistência horizontal, provavelmente poligênica, encontrada em cultivares obtidas pelo cruzamento de *C. arabica* com cafeeiros da espécie *C. canephora* e do Híbrido de Timor (Costa, 1978; Costa, Eskes e Ribeiro, 1978; Eskes, 1979).

As cultivares Obatã, Katipó, Tupi e Catucaís Vermelho e Amarelo descritas a seguir estão sendo avaliadas no campo experimental do Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA e foram selecionadas por apresentarem melhores resultados médios nas avaliações quanto às características agronômicas de interesse, principalmente com relação à resistência à ferrugem.

Obatã

A cultivar Obatã é derivada do cruzamento de Villa Sarchi com Híbrido de Timor (um provável híbrido interespecífico natural entre a variedade Arábica de *C. arabica* e a Robusta de *C. canephora*, encontrado no Timor Português – África) e posterior cruzamento natural com a cultivar Catuaí Vermelho.

Apresenta produção semelhante à da Catuaí Vermelho, porém com elevada resistência à ferrugem. Possui porte baixo, internódios curtos, folhas largas, cor verde nas folhas novas, frutos grandes e vermelhos com maturação tardia. A altura e diâmetro da copa são semelhantes aos da Catuaí Vermelho. É exigente quanto à fertilidade do solo e indicada, preferencialmente, para plantios adensados ou em renque (Melo, Bartholo e Mendes, 1998).

Tupi

A cultivar Tupi é derivada do cruzamento de Villa Sarchi com Híbrido de Timor (CIFC 832/2). O Híbrido F₁ (H 361/4) de V. Sarchi x H. Timor foi obtido no Centro Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Oeiras,

Portugal. A variedade Villa Sarchi, originária da Costa Rica, parece ter sido encontrada em plantações de Típica, Bourbon e outras cultivares de *C. arabica*.

A cultivar apresenta boa produção, semelhante à da Catuaí Vermelho, e elevada resistência à ferrugem. Possui porte baixo, internódios curtos, folhas novas de coloração bronzeada, frutos grandes e vermelhos, sendo a maturação mais precoce de que a das cultivares Catuaí Vermelho e Obatã (Melo, Bartholo e Mendes, 1998).

Catuaí Vermelho e Amarelo

A cultivar Catuaí foi desenvolvida a partir de uma população de Icatu Vermelho. Nessa população, foram identificadas e selecionadas 25 plantas que surgiram com porte baixo. Provavelmente essas plantas tiveram origem do cruzamento natural entre plantas da população de Icatu e de Catuaí, de onde surgiu a denominação Catuaí.

Os cafeeiros apresentam porte baixo, dos quais algumas seleções exibem porte médio, são mais vigorosos e resistentes à ferrugem. A arquitetura da planta é variável, havendo seleções com plantas cônicas, bem abertas e outras com plantas mais cilíndricas e compactas. A coloração das folhas novas é verde ou bronze. Os frutos, quando maduros, apresentam coloração vermelha ou amarela conforme a seleção (Melo, Bartholo e Mendes, 1998).

Katipó

Katipó é uma das seleções derivadas da cultivar Catimor. Essa cultivar teve origem no cruzamento entre a Caturra vermelho e o Híbrido de Timor e foi introduzida no Brasil em 1970/1971, através de sementes enviadas pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC). As progênies de Catimor

apresentam como caracteres de interesse a precocidade na produção e maturação dos frutos, peneira média alta, amplo espectro de resistência ao agente causal da ferrugem, baixo percentual de plantas aneuplóides e produtividade semelhante ao Catuaí até o quarto ano de produção acumulada. Apresentam, entretanto, menor vigor vegetativo e pequena longevidade causados por produções extremamente altas nas duas ou três primeiras produções e associados à causa do esgotamento das reservas das plantas, manifestando uma seca acentuada e progressiva dos ramos produtivos. As características de baixo vigor vegetativo, acentuado depauperamento e reduzida longevidade foram herdadas da variedade Caturra, utilizada como um dos progenitores da Catimor, em geração F₅, que apresenta resistência à ferrugem, aliada a um bom desenvolvimento vegetativo e razoável longevidade, além de outros caracteres de interesse, como é o caso da progênie Katipó (Mendes, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG.

Os meios de cultura devem suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento (Pasqual, 2000). Os meios de cultura utilizados no presente trabalho seguem uma seqüência de modificações de acordo com cada etapa da embriogênese somática (indução de calos, diferenciação ou condicionamento de calos e regeneração e formação de embriões), citados na Tabela 1.

TABELA 1. Componentes dos meios de culturas utilizados durante as etapas da embriogênese somática em *C. arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Componentes	IC ¹ (mg.L ⁻¹)	DC ¹ (mg.L ⁻¹)	R ¹ (mg.L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220,0	220,0	220,0
KH ₂ PO ₄	85,0	85,0	85,0
KNO ₃	950,0	950,0	950,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185,0	185,0	185,0
NH ₄ NO ₃	825,0	825,0	825,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0125	0,0125	0,0125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0125	0,0125	0,0125
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	3,1
KCl	0,415	0,415	0,415
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11,15	11,15	11,15
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,125	0,125	0,125
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,3	4,3	4,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13,90	13,90	13,90
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	18,65	18,65	18,65
Tiamina-HCl	10,0	10,0	10,0
Piridoxina-HCl	1,0	-	1,0
Ácido Nicotínico	1,0	-	1,0
Glicina	1,0	20,0	2,0
L-cisteína	-	40,0	-
Mio-inositol	100,0	200,0	200,0
Sulfato de Adenina	-	60,0	40,0
Caseína Hidrolisada	100,0	200,0	400,0
Extrato de malte	400,0	800,0	400,0
Sacarose	30.000	30.000	40.000
Agar	5.000	5.000	5.000

¹/ Berthouly e Michaux-Ferriere (1996)

IC: Indução de Calos

DC: Diferenciação de Calos

R: Regeneração

3.1 Indução de calos em cultivares de *C. arabica* L.

Foi utilizado para a instalação dos experimentos desta etapa o meio nutritivo semi-sólido "IC" (Tabela 1), de indução de calos, com pH ajustado para $5,6 \pm 1$ antes de ser autoclavado a 120°C , 1,2 atm, durante 20 minutos.

Os explantes foliares de *C. arabica* foram inoculados assepticamente em meio nutritivo na câmara de fluxo laminar horizontal e transferidos para sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As avaliações foram realizadas 90 dias após a instalação do experimento, analisando as seguintes variáveis: % de calos cicatriciais (CC), % de calos primários nodulares (CPN), % de calos primários mistos (CPM) e % de calos friáveis (CF).

3.1.1 Concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos da cultivar Obatã.

Foram utilizadas, como explantes primários, folhas jovens de ramos plagiotrópicos de plantas de *C. arabica* L. cv. Obatã, mantidas no campo experimental do Setor de Cafeicultura da UFLA; a cada 15 dias foram realizados tratamentos fitossanitários à base de fungicida. Após a coleta, as folhas foram desinfestadas com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar horizontal, estas foram lavadas três vezes consecutivas com água destilada autoclavada e mantidas em solução de 600 mg.L^{-1} de ácido ascórbico até serem inoculadas em meio de cultura.

Após a eliminação da nervura central, os explantes foram excisados em tamanhos de 1 cm^2 aproximadamente, das extremidades laterais, basais e apicais das folhas. Posteriormente foram inoculados com o lado abaxial voltado para a

superfície do meio nutritivo, acrescidos de 600 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, contido em tubos de ensaio (150x25mm) com 15ml de meio cada.

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L^{-1}) e Cinetina (0, 2, 4 e 8 mg.L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4, com 4 repetições e 10 explantes por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias analisadas por regressão polinomial.

3.1.2 Concentrações de 2,4-D na indução de calos em diferentes cultivares.

Os explantes utilizados na instalação do experimento foram folhas de *C. arabica* L. cvs. Obatã, Tupi, Katipó, Catucaís amarelo e vermelho, provenientes de partes aéreas micropropagadas, originadas de cultura de embriões zigóticos e estabelecidas *in vitro* durante 60 dias.

O meio nutritivo "IC" foi acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 2, 4 e 6 mg.L^{-1}) e de cinetina (2 mg.L^{-1}) em todos os tratamentos, e após a autoclavagem distribuíram-se 20 ml deste meio em placas de Petri previamente esterilizadas.

Os explantes foliares das cultivares de *C. arabica* receberam incisões realizadas com a ponta da lâmina do bisturi e foram posteriormente inoculados com o lado abaxial voltado para a superfície do meio.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, com 4 repetições e 10 explantes por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias das concentrações de

2,4-D foram analisadas por regressão polinomial, e das cultivares, através do teste Skott Knott.

3.2 Diferenciação de calos em cultivares de *C. arabica* L.

Durante a etapa de diferenciação dos calos utilizou-se, para a instalação dos experimentos o meio nutritivo “DC” semi-sólido de diferenciação ou condicionamento de calos (Tabela 1), com pH aferido para $5,6 \pm 1$ e distribuído em frascos de 100ml vedados com tampas de polipropileno. Em seguida, o meio foi autoclavado à temperatura de 120°C , 1,2 atm, durante 20 minutos.

Os explantes foram inoculados assepticamente em meio nutritivo, em câmara de fluxo laminar horizontal e transferidos para sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As avaliações foram realizadas 90 dias após a instalação dos experimentos, analisando as seguintes características: % de calos embriogênicos (CE), % de calos embriogênicos friáveis (CEF), peso da matéria fresca de calos (mg) e diâmetro de calos (cm).

3.2.1 Concentrações de BAP e 2,4-D na diferenciação de calos da cultivar Obatã.

Calos Primários Mistos (CPM) provenientes de segmentos de folhas da cultivar Obatã coletadas em campo foram transferidos para o meio de cultura semi-sólido “DC” de diferenciação ou condicionamento (Tabela 1), acrescido de diferentes concentrações de BAP (0, 2, 4 e 8 mg.L^{-1}) e 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg.L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4, com 4 repetições e 2 explantes por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias analisadas por regressão polinomial.

3.2.2 Concentrações de 2,4-D na diferenciação de calos em diferentes cultivares.

Calos Primários Mistos (CPM) das cultivares Obatã, Tupi, Katipó, Catucaís Amarelo e Vermelho, provenientes de explantes foliares de partes aéreas micropropagadas, foram transferidos para o meio de cultura semi-sólido "DC" (Tabela 1) de condicionamento ou diferenciação, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 0,5, 1 e 2 mg.L⁻¹).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, com 4 repetições e 2 explantes por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias de 2,4-D foram analisadas por regressão polinomial e as cultivares através do teste Skott Knott.

3.3 Formação de embriões a partir de calos em cultivares de *C. arabica* L.

O meio de cultura semi-sólido utilizado para a instalação dos experimentos de regeneração de calos foi o "R" (Tabela 1), com pH aferido para $5,6 \pm 1$, e distribuído em frascos de 100ml vedados com tampas de polipropileno. Após, o meio foi autoclavado à temperatura de 120°C, 1,2 atm, durante 20 minutos.

Os explantes foram inoculados assepticamente em meio nutritivo, em câmara de fluxo laminar horizontal, e transferidos para sala de crescimento com

temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, suprida por lâmpadas grow-lux e branca-fria, na proporção de 1:1.

3.3.1 Concentrações de BAP e sacarose na formação de embriões a partir de calos da cultivar Obatã.

Calos Embriogênicos Friáveis (CEF) provenientes de segmentos de folhas da cultivar Obatã coletadas em campo foram transferidos para o meio de cultura semi-sólido "R" de regeneração (Tabela 1), suplementado com diferentes concentrações de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L^{-1}) e sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×5 , com 3 repetições e 250 mg de calos embriogênicos friáveis por parcela.

As avaliações foram realizadas 90 dias após a instalação do experimento, quando se avaliou o número de embriões nos estádios globular, torpedo e cotiledonar.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias de BAP e sacarose foram avaliadas por regressão polinomial.

3.3.2 Concentrações de BAP na formação de embriões a partir de calos em diferentes cultivares.

Calos Embriogênicos (CE) das cultivares Obatã, Tupi, Katipó, Catucais Amarelo e Vermelho, provenientes de partes aéreas micropropagadas, foram inoculados em meio de cultura semi-sólido "R" (Tabela 1) de regeneração, acrescido de diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2 e 4 mg.L^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, com 3 repetições e 250 mg de calos embriogênicos por parcela.

As avaliações foram realizadas 120 dias após a instalação do experimento, quando se avaliou o número de embriões nos estádios globular, torpedado e cotiledonar.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, as médias de BAP foram analisadas por regressão polinomial, e as cultivares, através do teste Skott Knott.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação causada por fungos e bactérias e a oxidação por substâncias fenólicas são fatores limitantes no estabelecimento *in vitro* de explantes foliares de *C. arabica* provenientes de material coletado em campo. Através do controle fitossanitário realizado nas plantas selecionadas no campo e do processo de assepsia em laboratório, pode-se afirmar que houve 75% de eficiência no controle da contaminação; com a adição de ácido ascórbico (600 mg.L⁻¹) em meio de cultura não houve ocorrência de explantes oxidados (dados não mostrados).

4.1 Indução de calos em cultivares de *C. arabica* L.

4.1.1 Concentrações de 2,4-D e Cinetina na indução de calos da cultivar Obatã.

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão representados na Tabela 2. Observa-se que a interação entre os reguladores de crescimento foi significativa ao nível de 1% de probabilidade para todas as variáveis.

TABELA 2. Análise de variância para as características porcentagem de calos cicatriciais (%CC), de calos primários nodulares (%CPN), de calos primários mistos (%CPM) e de calos friáveis (%CF). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio			
		% CC	% CPN	% CPM	% CF
2.4-D	3	789,583**	693,229**	7993,229**	3289,583*
Cinetina	3	43,750ns	18,229**	1014,062**	1739,583ns
2.4-DxCin.	9	88,194**	121,006**	2419,618**	2645,138**
Erro	48	19,791	14,062	136,979	68,750
C.V. (%)		74,93	72,73	30,33	54,15

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

Porcentagem de Calos Cicatriciais

Analisando as curvas de regressão para esta variável, observa-se na Figura 1, que houve maior reação cicatricial em explantes foliares da cultivar Obatã quando se adicionou ao meio de cultura cinetina nas concentrações 2, 1 e 4 mg.L⁻¹, respectivamente, ao meio de cultura. Entretanto, o 2,4-D promoveu

inibição na formação destes calos, mesmo na menor concentração utilizada (2 mg.L⁻¹).

Comparando as três curvas, pode-se notar que a adição de 2 mg.L⁻¹ de cinetina ao meio de cultura, sem a utilização de 2,4-D, apresentou maior frequência de CC's. Resultados similares foram obtidos por Cordeiro (1999), que observou uma reação cicatricial em frequência de cerca de 20% em explantes foliares dos genótipos Catimor e Diplóide DH₃ em meio sem auxina. Santos et al. (2000) obtiveram explantes sem qualquer tipo de reação e/ou calo apenas cicatricial em meios de cultura que continham como regulador de crescimento apenas citocinina para as cultivares Catimor e Catuaí Vermelho.

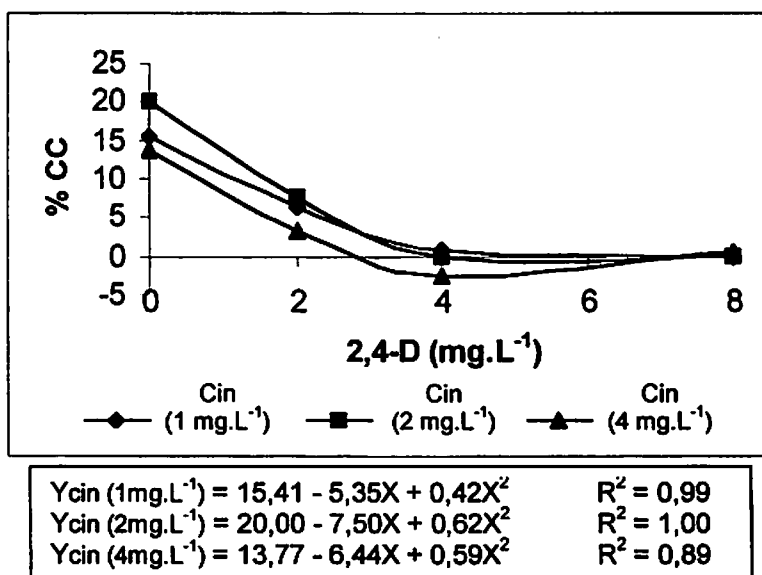


FIGURA 1. Porcentagem de calos cicatríciais (CC) formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Primários Nodulares

Na ausência de cinetina, houve um decréscimo linear associado ao aumento das concentrações de 2,4-D (Figura 2). Para as concentrações de cinetina 2 e 4 mg.L⁻¹, ocorreu um decréscimo significativo na frequência de CPN's quando foram adicionadas, ao meio de cultura, concentrações crescentes de 2,4-D. Estes resultados assemelham-se aos obtidos para a característica anterior.

Neste caso, o fato de a auxina promover inibição na formação de CPN's concorda com os resultados obtidos por Cordeiro (1999), quando os explantes foliares foram cultivados em meio suplementado apenas com citocinina. No entanto, Santos et al. (2000), estudando vários genótipos de *Coffea*, observaram resultados contraditórios, nos quais a adição simultânea de auxina e citocinina no meio de cultura MS induziu o aparecimento de CPN's.

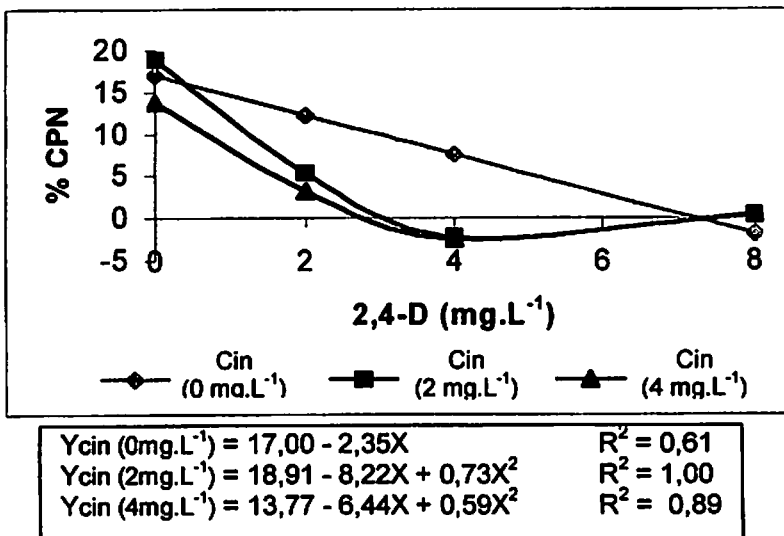


FIGURA 2. Porcentagem de calos primários nodulares (CPN) formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Primários Mistos

Maior porcentagem de CPM's (Figura 3), foi obtida com a utilização de 4,18 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2 mg.L⁻¹ de cinetina, ou seja, a razão auxina/citocinina 2:1 proporcionou maior formação de CPM's em explantes foliares, correspondendo a uma frequência de 80,5%.

Os resultados obtidos concordam com Cordeiro (1999), segundo o qual explantes foliares de Catimor, ao serem submetidos a diferentes associações de meios de indução à calogênese, adicionados dos reguladores de crescimento 2,4-D, cinetina e BAP e em genótipos Apatã e DH₃, utilizando-se a relação auxina/citocinina no meio primário, promoveram a formação de CPM's.

Os CPM's, além da reação globular, apresentam formações amorfas de células alongadas, que se caracterizam por crescimento visivelmente mais rápido. Os calos primários têm sido associados às células perivasculares (Berthouly e Michaux-Ferriere, 1996; Bieysse, Gofflot e Michaux-Ferriere (1993), e às do parênquima lacunoso do mesofilo (Pierson et al., 1983; Sondahl et al., 1979). Segundo Berthouly e Michaux-Ferriere (1996) as células mesofílicas, ao retomarem à divisão celular, originam os calos primários, que podem conter duas distintas populações de células, uma constituída de células alongadas e vacuolizadas e a outra de pequenas células cilíndricas com citoplasma denso, ou seja, células embriogênicas.

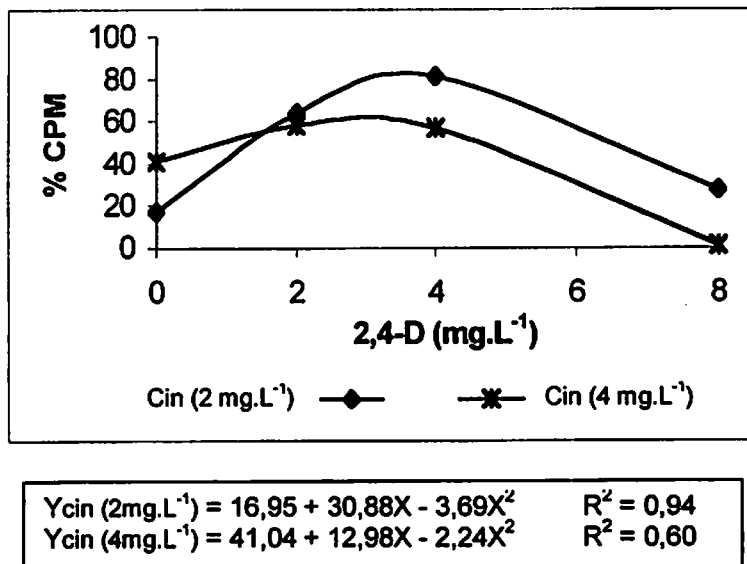


FIGURA 3. Porcentagem de calos primários mistos (CPM), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Friáveis

Observando a Figura 4, pode-se concluir que o tratamento que induziu a maior formação de CF's foi a combinação de 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D com 2 mg.L⁻¹ de cinetina, sugerindo o incremento de concentrações mais elevadas da auxina. Entretanto, as concentrações 1 e 4 mg.L⁻¹ de cinetina adicionadas em meio de cultura, na ausência de 2,4-D, promoveram também a indução de CF's, porém em menor frequência.

Os calos friáveis são aqueles desprovidos de embriões, e resultados similares aos observados foram obtidos por Berthouly e Michaux-Fierrere (1996) em explantes foliares de *C. canephora*.

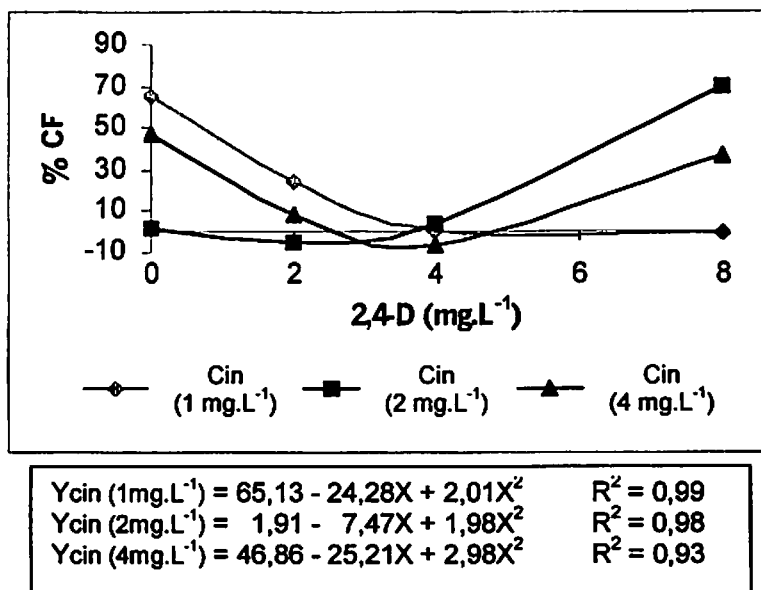


FIGURA 4. Porcentagem de calos friáveis (CF), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D e Cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2001.

4.1.2 Concentrações de 2,4-D na indução de calos em cultivares de *C. arabica* L.

O resumo da análise de variância está apresentado na Tabela 3. Pode-se observar que a interação entre os fatores foi significativa ao nível de 1% de probabilidade para todas as variáveis analisadas.

TABELA 3. Análises de variância para as características porcentagem de calos cicatriciais (%CC), de calos primários nodulares (%CPN), de calos primários mistos (%CPM) e de calos friáveis (%CF). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio			
		% CC	% CPN	% CPM	% CF
2.4-D	3	4020,00**	360,00*	8093,33**	3645,00**
Cultivares	4	120,00*	242,50ns	2957,50**	1520,00**
2.4-DxCultivares	12	153,33**	439,16**	1830,83**	1520,00**
Erro	60	40,00	96,66	320,00	25,00
C.V. (%)		60,23	70,23	47,00	74,07

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

Porcentagem de Calos Cicatriciais

A suplementação do meio de cultura com 2,4-D foi prejudicial para a indução de calos cicatriciais para todas as cultivares (Figura 5). A cultivar Tupi se destacou das demais, apresentando uma frequência de 44%, em meio de cultura acrescido apenas de cinetina (em todos os tratamentos foram adicionados 2 mg.L^{-1} de cinetina). Nota-se que os resultados foram similares aos observados no experimento 4.1.1, quando foram utilizadas folhas coletadas em campo. Estes resultados obtidos concordam com Santos et al. (2000), que estudando a indução de calos nos genótipos Catimor, Cavimor e Catuaí Vermelho, observaram que as maiores frequências de CC's ocorreram em meios de cultura que continham apenas citocinina.

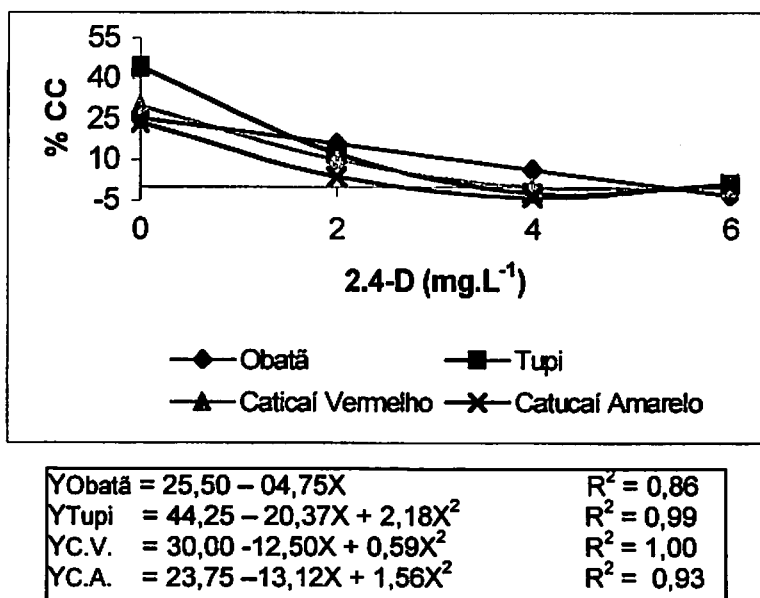


FIGURA 5. Porcentagem de calos cicatríciais (CC), formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Obatã, Tupi, Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Primários Nodulares

Através da Figura 6, observa-se que as cultivares se portaram de maneira distinta em relação às concentrações de 2,4-D. As cultivares Katipó e Tupi apresentaram maior frequência na concentração máxima utilizada de 2,4-D, podendo, portanto, sugerir o incremento de concentrações mais elevadas desta auxina com o objetivo de aumentar a frequência da porcentagem de calos primários nodulares formados. No entanto, as cultivares Catucaís Vermelho e Amarelo apresentaram-se melhores na ausência de 2,4-D, bastando a suplementação com 2 mg.L⁻¹ de cinetina, obtendo uma frequência de aproximadamente 25% em ambas cultivares.

O efeito positivo da combinação entre auxina e citocinina para esta característica também foi observado por Santos et al. (2000) em genótipos de *Coffea*. Por outro lado, Cordeiro (1999) verificou, de maneira geral, superioridade da freqüência de CPN's em relação aos CPM's, em explantes foliares de *C. canephora*, utilizando apenas citocinina.

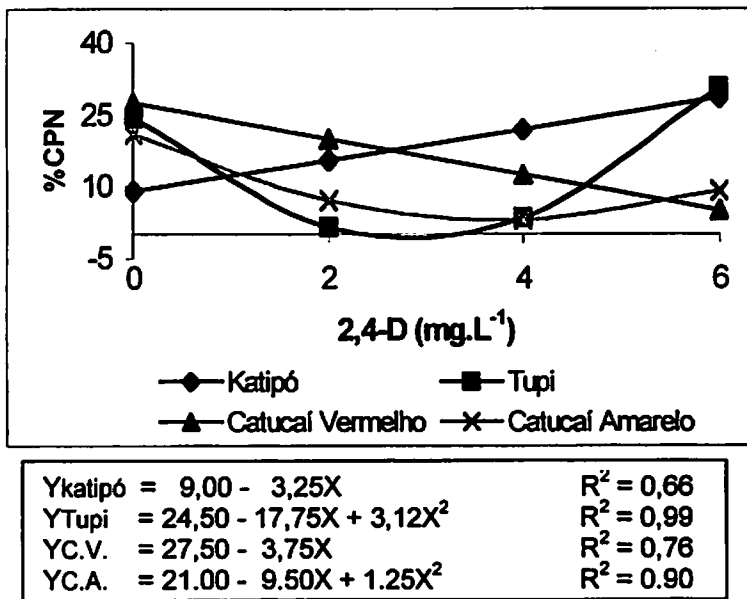


FIGURA 6. Porcentagem de calos primários nodulares (CPN), formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Katipó, Tupi, Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Primários Mistos

Analisando as curvas de regressão dos dados obtidos (Figura 7), observa-se que para as cultivares Obatã e Tupi, as curvas apresentaram a mesma tendência em relação às concentrações de 2,4-D. As porcentagens de CPM's para as cultivares Catucaí Amarelo, Obatã e Tupi foram 75, 78 e 86% e estão

diretamente relacionadas com as concentrações da auxina, atingindo seu ponto máximo com 2, 3,2 e 3,4 mg.L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente.

Neste caso, verifica-se que os CPM's formados em explantes provenientes de folhas micropropagadas das cultivas Obatã, Tupi e Catucaí Amarelo, apresentam um comportamento semelhante àqueles induzidos em folhas coletadas em campo da cultivar Obatã, em relação à ação conjunta de 2,4-D e cinetina. Santos et al. (2000) também observaram influência positiva da relação auxina/citocinina em Catimor e Catucaí Vermelho. Contudo, Cordeiro (1999) verificou que na presença de 2,4-D e Cinetina em Catimor, prevalece, de maneira geral, a formação de CPM's.

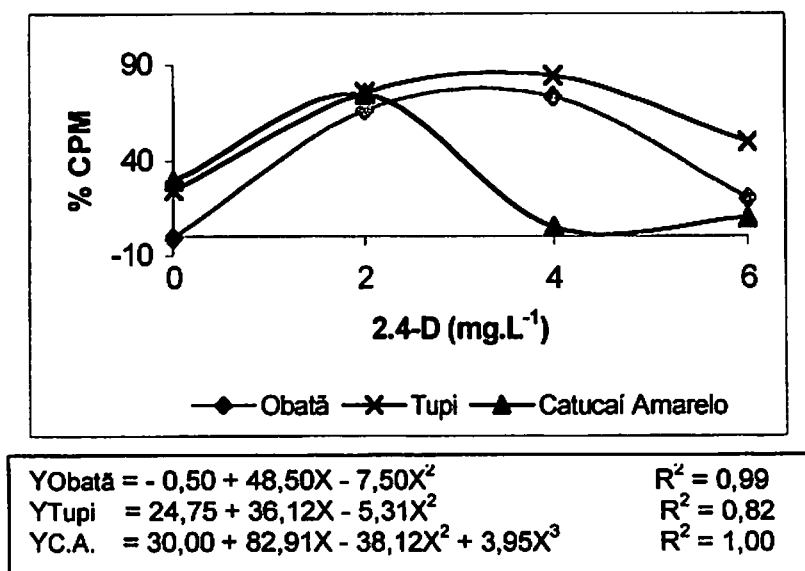


FIGURA 7. Porcentagem de calos primários mistos (CPM), formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Obatã, Tupi e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de 2,4-D (mg.L⁻¹). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Friáveis

As curvas de regressão para as cultivares Catucaí Amarelo e Vermelho seguem a mesma tendência, atingindo o ponto máximo com 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D. A ausência de 2,4-D inibiu a formação de CF's. Resultados semelhantes foram obtidos por Cordeiro (1999), observando que a adição de 2,4-D em meio de cultura aumentou a frequência de CF's em até 20%, concordando também com Berthouly e Michaux-Ferriere (1996), que verificaram inibição na produção de embriões globulares na presença de 2,4-D (CF's) em *C. canephora* cv. Apoatã.

De maneira geral, pode-se observar que a reação calogênica foi superior em folhas provenientes de material micropropagado em relação às coletadas em campo, pois estas últimas estão diretamente expostas à ação de agentes contaminantes.

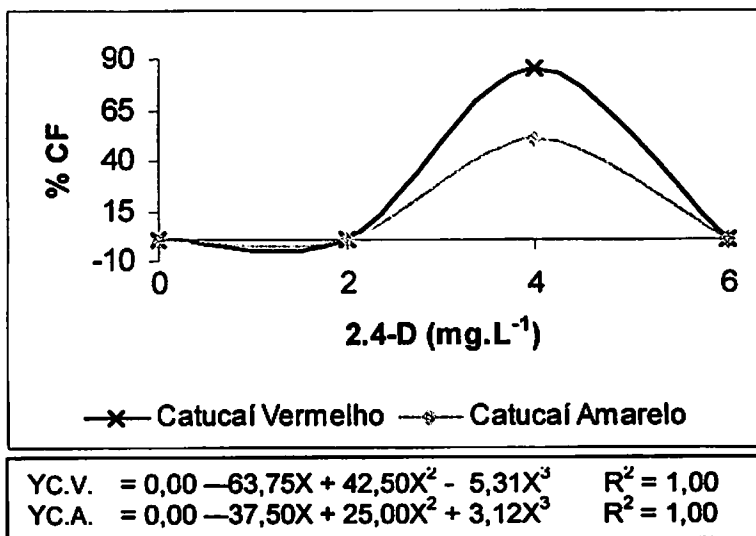


FIGURA 8. Porcentagem de calos friáveis (CF), formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

4.2 Diferenciação de calos em cultivares de *C. arabica* L.

4.2.1 Concentrações de BAP e 2,4-D na diferenciação de calos da cultivar Obatã

O resumo da análise de variância, para as características avaliadas está representado na Tabela 4. Verifica-se que para as características porcentagem de calos embriogênicos (CE's), porcentagem de calos embriogênicos friáveis (CEF's) e peso da matéria fresca de calos (PMFC), houve efeito significativo da interação entre os fatores enquanto, para o diâmetro de calos, houve efeito significativo apenas para concentrações de BAP (mg.L^{-1}) e 2,4-D (mg.L^{-1}).

TABELA 4. Análise de variância para as características porcentagem de calos embriogênicos (%CE), de calos embriogênicos friáveis (%CEF), peso da matéria fresca de calos (PMFC) e diâmetro de calos. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	Quadrado Médio				Diâmetro de Calos
	GL	% CE	% CEF	PMFC	
BAP	3	276,182ns	5794,270**	584371,45**	1,161**
2,4-D	3	582,682*	325,520ns	108273,29**	0,954**
BAP*2,4-D	9	356,987*	872,395**	17677,27**	0,088ns
Erro	48	159,505	201,822	3881,58	0,064
C.V. (%)		65,98	35,66	20,52	21,56

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

Porcentagem de Calos Embriogênicos

Conforme se observa na Figura 9, a maior frequência de CE's, que correspondem aos calos embriogênicos de baixa frequência (CEBF), foi obtida com a utilização de 1 mg.L^{-1} de 2,4-D associado à concentração máxima de BAP

(8 mg.L⁻¹), apresentando uma frequência de 40%. Porém, resultados obtidos com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D na ausência da citocinina foram bastantes satisfatórios, atingindo uma frequência de 33% de CE's.

Berthouly e Michaux-Fierrere (1996), estudando genótipos de *C. canephora*, observaram que a adição de BAP em concentrações acima de 1,5µM favorece mais a diferenciação de células embriogênicas em relação à sua multiplicação por alterar, provavelmente, a polaridade e o plano de divisão da célula (Williams e Maheswaran, 1986).

A relação auxina/citocinina e a utilização de BAP isoladamente promoveram a diferenciação em calos embriogênicos. Garcia e Menendez (1987) verificaram que a associação de 2,4-D e BAP induziu calos embriogênicos durante a fase de diferenciação; em meio de cultura com a presença apenas de BAP, ocorreu embriogênese direta em baixa frequência em *Coffea*. Contudo, Cordeiro (1999), estudando cultivares de *C. arabica*, verificou que calos embriogênicos foram produzidos, aos sete meses de indução, tanto na ausência quanto na presença de auxina; porém, as maiores frequências desses calos foram observadas quando a auxina esteve presente na cultura primária associada a cinetina, seguida da repicagem para o meio com BAP combinado ou não com 2,4-D.

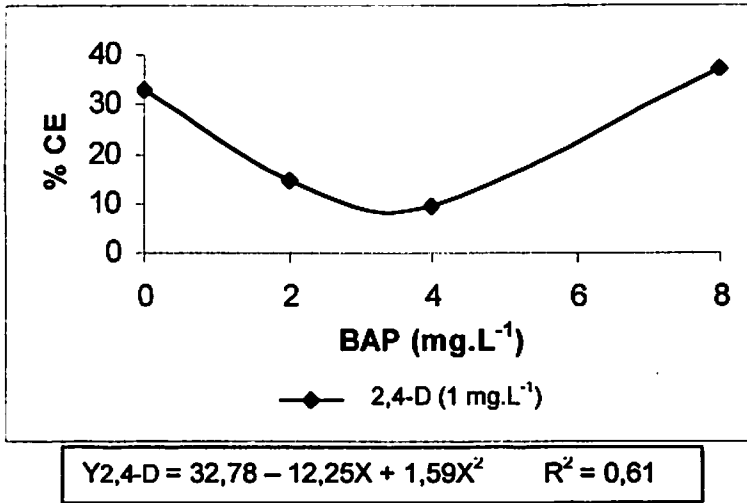


FIGURA 9. Porcentagem de calos embriogênicos (CE), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Porcentagem de Calos Embriogênicos Friáveis

De acordo com a Figura 10, maiores freqüências de CEF's foram obtidas com a utilização de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D com concentrações crescentes de BAP, seguindo uma tendência linear, sugerindo, portanto, a possibilidade de incrementar concentrações de BAP acima de 8 mg.L⁻¹ com o objetivo de aumentar a freqüência de CEF's. Resultados semelhantes foram obtidos com a concentração de 8 mg.L⁻¹ de BAP sem a adição ao meio de cultura de 2,4-D

Segundo Sondahl e Sharp (1977), a ação combinada de auxina/citocinina é fundamental para a obtenção de calos embriogênicos friáveis em *Coffea*, o que foi posteriormente comprovado por Garcia e Menendez (1987) em explantes foliares de Catimor. Os resultados obtidos no presente experimento concordam com àqueles apresentados por Cordeiro (1999), que verificou um efeito negativo da auxina 2,4-D na freqüência de CEF's, à semelhança do efeito inibidor de ANA em explantes foliares da variedade Typica em meio contendo BAP

(Yasuda, et al., 1995). A formação de CEF's foi obtida, também, por Tahara et al. (1994) adicionando ao meio de cultura apenas a citocinina BAP.

Contudo, Caligari e Shohet (1993) têm sugerido que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio de cultura com 2,4-D causa variações genéticas e epigenéticas que afetam o potencial embriogênico em algumas espécies.

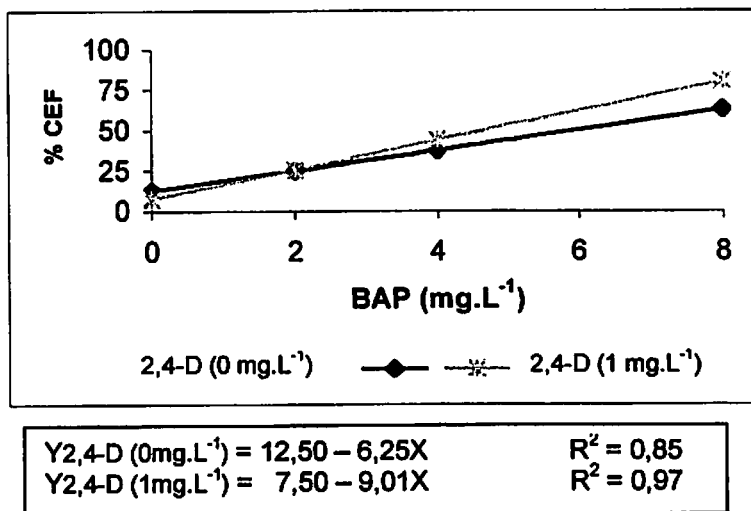
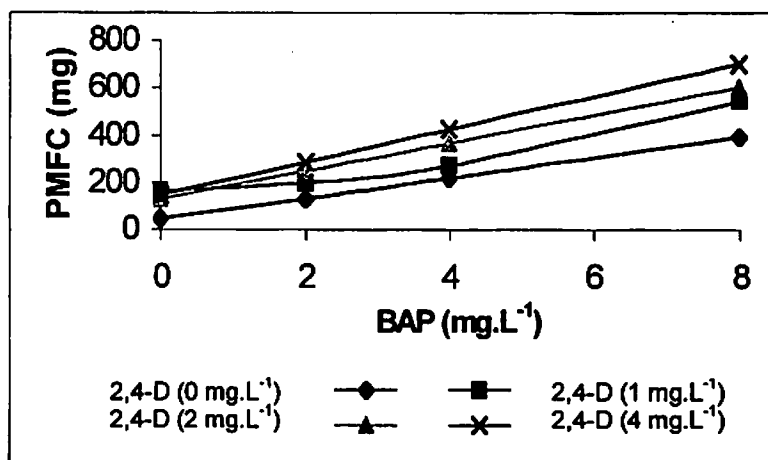


FIGURA 10. Porcentagem de calos embriogênicos friáveis (CEF's), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da Matéria Fresca de Calos

Analisando as curvas de regressão, pode-se observar uma mesma tendência das concentrações de 2,4-D em relação ao BAP (Figura 11). O melhor resultado para esta característica foi obtido na combinação de 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D com a concentração máxima de BAP (8 mg.L⁻¹), verificando-se, assim, uma tendência linear, indicando que o incremento de concentrações mais elevadas de BAP apresenta influência positiva no aumento desta variável.

Estes resultados confirmam aqueles obtidos para as variáveis anteriores, em que as maiores freqüências foram obtidas com a combinação entre 2,4-D e BAP, sendo este último em maior concentração. Concordam também com os obtidos por Herman e Hass (1975), que utilizaram concentrações muito baixas de cinetina (0,1 mg.L⁻¹) e 2,4-D (0,1 mg.L⁻¹), verificando reduzido crescimento e desenvolvimento de calos de *Coffea*.



$Y_{2,4-D (0mg.L^{-1})} = 42,90 + 43,52X$	$R^2 = 0,93$
$Y_{2,4-D (1mg.L^{-1})} = 161,72 - 7,05X + 5,07X^2$	$R^2 = 0,99$
$Y_{2,4-D (2mg.L^{-1})} = 129,45 + 59,15X$	$R^2 = 0,91$
$Y_{2,4-D (4mg.L^{-1})} = 145,85 + 69,59X$	$R^2 = 0,92$

FIGURA 11. Peso da matéria fresca de calos (mg), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã em concentrações de BAP e 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Diâmetro de Calos

Para a variável diâmetro de calos, houve efeito significativo tanto para BAP como para a auxina 2,4-D (Figura 12). Com relação às concentrações de BAP, observa-se que os maiores valores para esta variável foram obtidos à

medida que aumentaram as concentrações de BAP. Analisando a Figura 13, verifica-se que o maior diâmetro de calos foi obtido com a adição de 3,15 mg.L⁻¹ de 2,4-D ao meio de cultura.

Os resultados concordam com os obtidos por Almeida et al. (2000), que observaram os maiores diâmetros de calos em explantes foliares de *C. arabica*, mantidos em ausência de luminosidade e em meio de cultura contendo 2,4-D e cinetina simultaneamente. No presente experimento, as concentrações de 2,4-D e da citocinina BAP não apresentaram interação significativa.

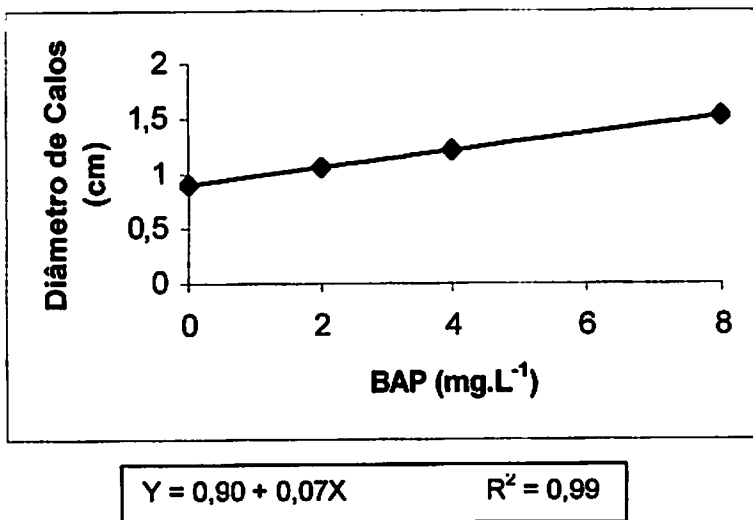


FIGURA 12. Diâmetro de calos (cm), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

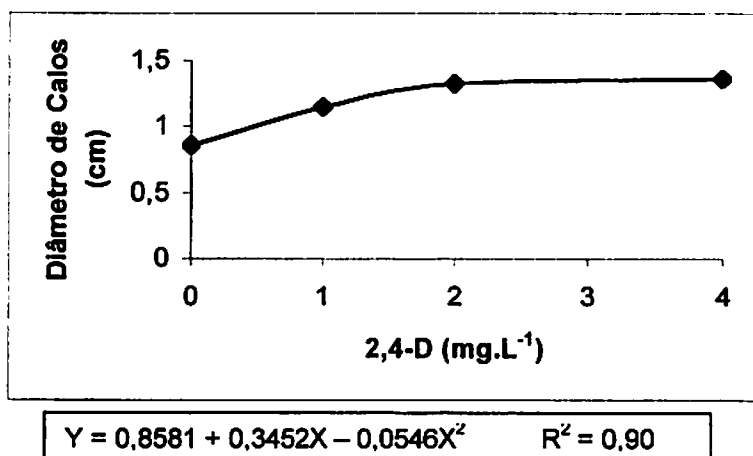


FIGURA 13. Diâmetro de calos (cm), em explantes foliares de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

4.2.2 Concentrações de 2,4-D na diferenciação de calos em diferentes cultivares.

Os resultados da análise de variância, para as características avaliadas, estão apresentados na Tabela 5. Verifica-se que houve efeito significativo da interação entre os fatores para todas as variáveis.

TABELA 5. Análise de variância para as características porcentagem de calos embriogênicos (%CE), de calos embriogênicos friáveis (%CEF), peso da matéria fresca de calos (PMFC) e diâmetro de calos. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio			
		% CE	% CEF	PMFC	Diâmetro de Calos
2.4-D	3	12403,64**	2632,81**	71136,62**	0,722**
Cultivares	4	167,96ns	66,40ns	4074,50**	0,161ns
2.4-DxCult.	12	1016,92**	243,48**	2173,83*	0,195*
Erro	60	346,35	75,52	951,21	0,089
C.V. (%)		33,65	89,71	30,38	31,61

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

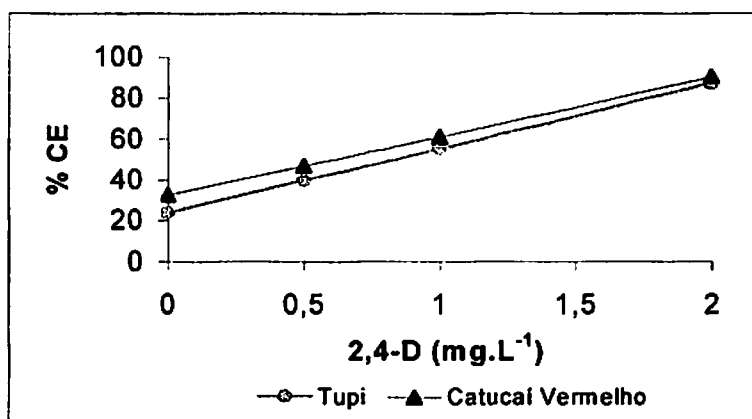
Porcentagem de Calos Embriogênicos

De acordo com a Figura 14, observa-se que à medida que aumentam as concentrações de 2,4-D no meio de cultura, conseqüentemente aumentam também as freqüências de CE's para as cultivares Tupi e Catucaí Vermelho. Evidencia-se, assim, a importância da auxina para a formação de calos embriogênicos em explantes foliares provenientes de partes aéreas micropropagadas de *C. arabica*.

Estes resultados mostram a competência dos explantes foliares obtidos *in vitro* na formação de CE's, apresentando uma freqüência de 87%, concordando com Cordeiro (1999) quando afirma que os explantes foliares de partes aéreas micropropagadas exigem menos tempo para produção de calos embriogênicos, quando comparados aos explantes retirados de plantas mantidas no campo. Este mesmo autor, estudando a reação calogênica de explantes foliares do diplóide DH₃ obtidos *in vitro*, revelou que aos três meses da indução, praticamente 100% dos calos eram embriogênicos e cerca de 35% eram também friáveis.

Porcentagem de Calos Embriogênicos Friáveis

Analisando as curvas de regressão (Figura 15), observa-se que houve uma mesma tendência no comportamento das cultivares Obatã, Katipó, Tupi e Catucaí Amarelo em relação às concentrações de 2,4-D. Contudo, os melhores resultados foram obtidos com as cultivares Tupi e Obatã, que apresentaram uma freqüência de 25% quando se utilizou 0,9 mg.L⁻¹ de 2,4-D.



$Y_{Tupi} = 23,75 + 31,78X$	$R^2 = 0,82$
$Y_{C.V.} = 32,50 + 28,92X$	$R^2 = 1,00$

FIGURA 14. Porcentagem de calos embriogênicos (CE), formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Tupi e Catucaí Vermelho, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Cordeiro (1999), segundo o qual, a freqüência de CEF's foi menos favorável, aproximadamente a metade, em explantes foliares de partes aéreas micropropagadas, quando comparados com explantes provenientes de plantas cultivadas em campo. Essa menor freqüência de CEF's é decorrente do estado fisiológico de desenvolvimento observado também por Bieysse, Gofflot e Michaux-Ferriere (1993), utilizando cultivares de *C. arabica*. Berthouly e Michaux-Fierriere (1996), obtiveram maior freqüência de calos embriogênicos de alta freqüência (CEAF), em *C. canephora*, utilizando como explantes folhas de cafeeiros nos estádios de floração, coletadas em campo, e de frutos chumbinhos.

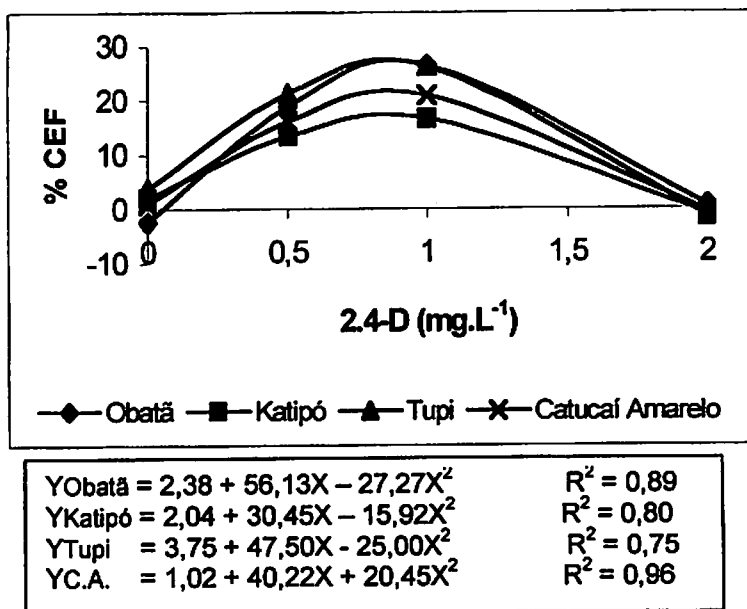


FIGURA 15. Porcentagem de calos embriogênicos friáveis (CEF), formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Obatã, Katipó, Tupi, e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da Matéria Fresca de Calos

As cultivares Obatã, Katipó e Catucaís Vermelho e Amarelo apresentaram maior peso da matéria fresca de calos à medida que aumentaram as concentrações de 2,4-D (Figura 16). O maior peso para esta característica foi de aproximadamente 209 mg, apresentando um valor relativamente baixo, quando comparado com o peso da matéria fresca de calos em explantes oriundos de plantas cultivadas em condições de campo (Figura 11). Neste caso, a maioria dos calos formados foram embriogênicos e apresentaram um volume visivelmente inferior ao dos calos embriogênicos friáveis formados, em maior frequência no experimento anterior dessa etapa.

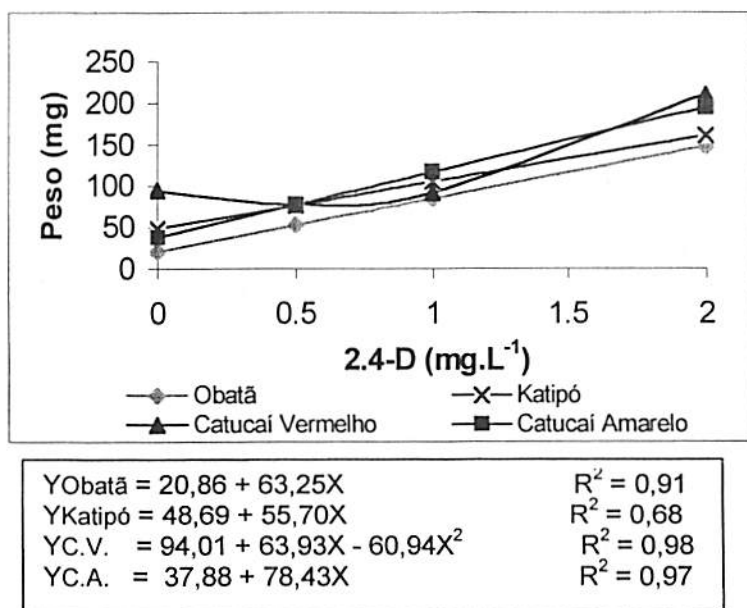
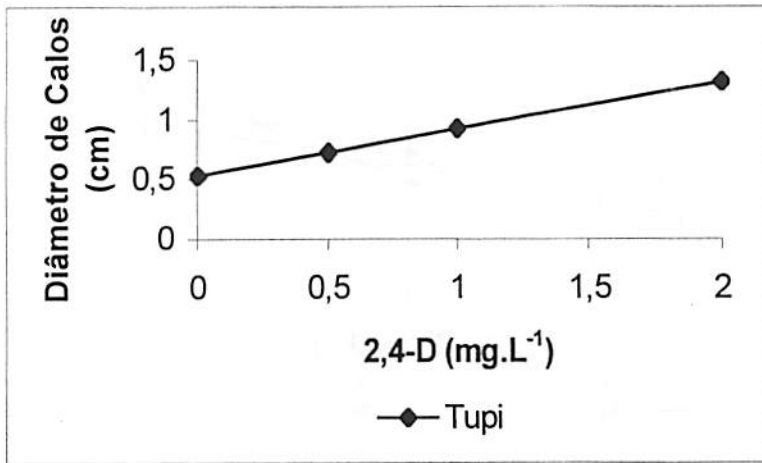


FIGURA 16. Peso da matéria fresca de calos formados em explantes foliares de *C. arabica* cvs.: Obatã, Katipó, Catucaí Vermelho e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Diâmetro de Calos

Analisando a Figura 17, observa-se que aumentando concentrações crescentes de 2,4-D para a cultivar Tupi, o diâmetro de calos aumentou significativamente, sugerindo um incremento nas concentrações de auxina, com o objetivo de aumentar o diâmetro desta variável. No entanto, Almeida et al. (2000) observaram maior diâmetro de calos em explante foliares de *C. arabica* quando cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D associado à cinetina.

Estes resultados apresentam um diâmetro relativamente semelhante, quando comparado àqueles calos oriundos de explantes foliares de plantas cultivadas em campo, ou seja, o estado fisiológico dos explantes não apresentou qualquer influência evidente para esta variável.



$$Y_{\text{Tupi}} = 0,53 + 0,39X \quad R^2 = 0,75$$

FIGURA 17. Diâmetro de calos (cm), formados em explantes foliares de *C. arabica* cv. Tupi, em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras-MG, 2001.

4.3 Formação de embriões a partir de calos em cultivares de *C. arabica* L.

4.3.1 Concentrações de BAP e sacarose na formação de embriões a partir de calos da cultivar Obatã.

O resumo da análise de variância para as características avaliadas está apresentado na Tabela 6, mostrando que a interação entre os fatores foi significativa ao nível de 1% de probabilidade para todas as variáveis.

TABELA 6. Análise de variância para as características número de embriões globulares (NEG), número de embriões torpedos (NET) e número de embriões cotiledonares (NEC). UFLA, Lavras-MG, 2001.

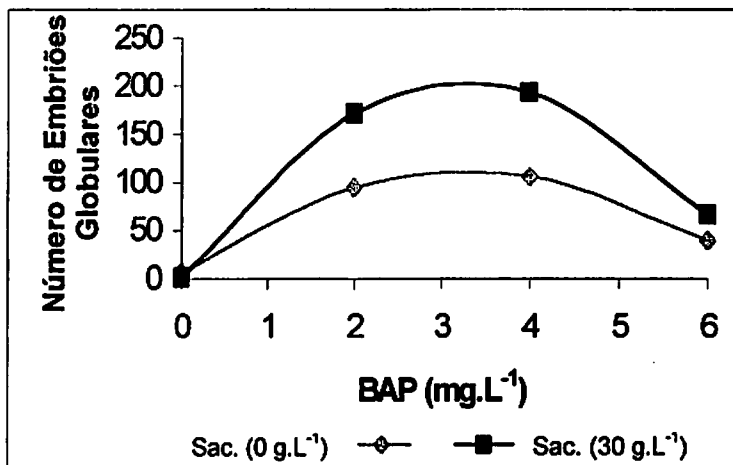
Causas de Variação	GL	Quadrado Médio		
		NEG	NET	NEC
BAP	3	55932,45**	18865,71**	1011,12**
Sacarose	4	9467,77**	10980,94**	453,97**
BAPxSacarose	12	10893,63**	3642,41**	500,80**
Erro	40	185,01	125,10	17,00
C.V. (%)		19,56	30,76	75,19

** , significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Número de Embriões Globulares

Analisando a Figura 18, pode-se observar que a utilização de 30 g.L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura promoveu uma média de 202 de embriões globulares até o nível máximo de 3,3 mg.L⁻¹ de BAP, registrando-se redução na presença de concentrações mais elevadas.

Confirma-se assim, a importância da utilização de uma fonte de carboidrato no meio de cultura, sendo que a sacarose influencia diretamente os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (Guerra, Torres e Teixeira, 1999). Estes resultados também são coerentes com aqueles apresentados por Berthouly e Etienne (2000), que obtiveram formação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos friáveis cultivados em meio secundário contendo apenas BAP.



$$Y_{\text{sacarose (0g.L}^{-1})} = 6,33 + 63,25X - 9,62X^2 \quad R^2 = 0,89$$

$$Y_{\text{sacarose (30g.L}^{-1})} = 0,68 + 122,50X - 18,60X^2 \quad R^2 = 0,99$$

FIGURA 18. Número de embriões globulares, formados em calos de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e Sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número de Embriões Torpedos

A concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose, assim como na variável anterior, proporcionou o maior número de embriões torpedos quando associada a 3 mgL⁻¹ de BAP (Figura 19). Com a adição ao meio de 15 g.L⁻¹ de sacarose, houve uma pequena redução no número de embriões quando comparado com o dobro desta concentração. A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais recomendada na embriogênese somática. Normalmente a concentração de 3% de sacarose é satisfatória para a iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (Guerra, Torres e Teixeira, 1999), evidenciando, assim, os resultados obtidos para esta variável.

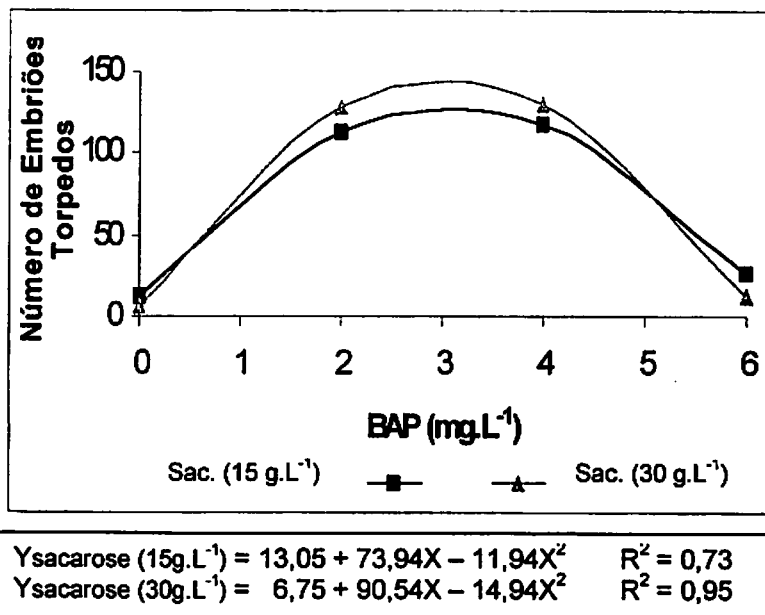


FIGURA 19. Número de embriões torpedos, formados em calos de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número de Embriões Cotiledonares

O maior número de embriões cotiledonares foi obtido quando da utilização de 45 g.L⁻¹ de sacarose combinados com 2 mg.L⁻¹ da citocinina BAP (Figura 20). A curva, após atingir o ponto máximo em relação às concentrações de BAP, apresentou queda bastante acentuada, chegando a não apresentar formação de embriões quando atingiu 4 mg.L⁻¹ de BAP.

A formação de embriões, de uma maneira geral, foi obtida neste experimento quando foram utilizados como explantes calos embriogênicos friáveis, que tiveram como explantes primários folhas provenientes de plantas cultivadas em campo. Resultados semelhantes foram obtidos por Sondahl e

Sharp (1977), segundo os quais CEF's originam cerca de 100 a 300 embriões por explante cultivado em meio semi-sólido.

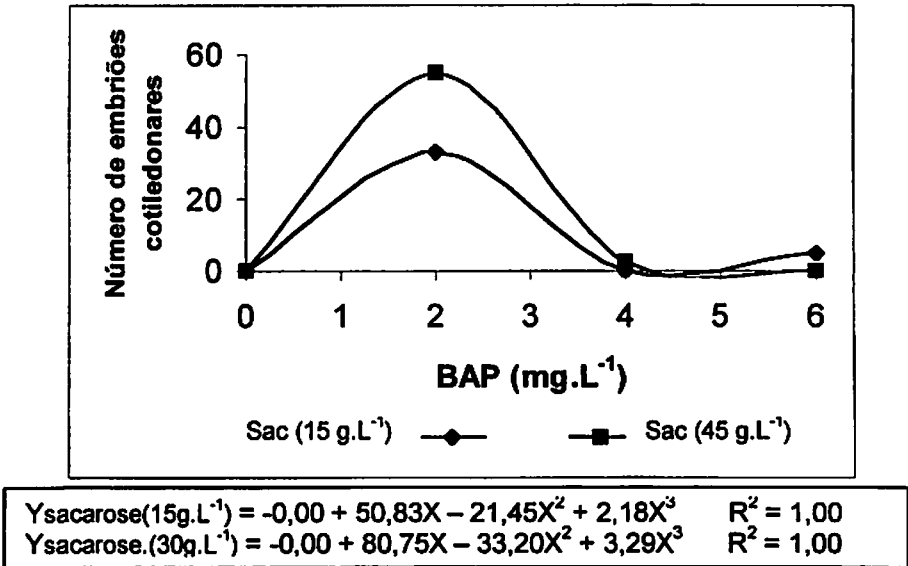


FIGURA 20. Número de embriões cotiledonares, formados em calos de *C. arabica* cv. Obatã, em diferentes concentrações de BAP e Sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

4.3.2 Concentrações de BAP na formação de embriões a partir de calos em diferentes cultivares

O resultado da análise de variância é apresentado na Tabela 7. Observa-se que para as características número de embriões globulares e número de embriões cotiledonares, houve efeito significativo da interação entre os fatores a nível de 1% de probabilidade. Para a característica número de embriões torpedos, houve efeito significativo apenas para cultivares e concentrações de BAP.

TABELA 7. Análise de variância para as características número de embriões globulares (NEG), número de embriões torpedos (NET) e número de embriões cotiledonares (NEC). UFLA, Lavras-MG, 2001.

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio		
		NEG	NET	NEC
BAP	3	164,46**	135,86**	6,63**
Cultivares	4	80,79**	68,43**	3,22**
BAPxCultivares	12	39,11**	18,92ns	2,62**
Erro	40	12,71	12,63	0,43
C.V. (%)		55,57	70,15	48,76

** , significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Número de Embriões Globulares

Analisando a Figura 21, verifica-se que as cultivares Tupi e Catucaí Amarelo apresentaram tendências semelhantes em relação às concentrações de BAP. Pode-se observar que a cultivar Catucaí Amarelo apresentou 15 embriões/explante, quando foram acrescentados ao meio de cultura 2 mg.L⁻¹ de BAP, assim como para a cultivar Tupi. Estes resultados assemelham-se àqueles apresentados por Berthouly e Etienne (2000), que obtiveram embriões somáticos em *C. arabica* em meio de cultura acrescido de BAP.

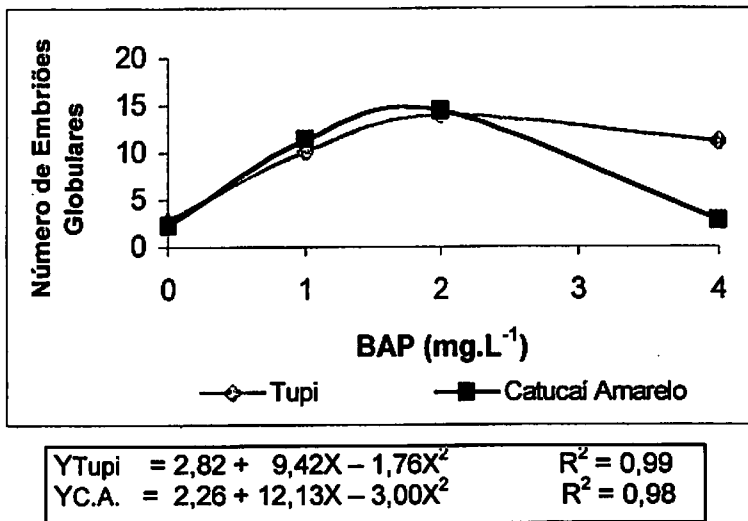


FIGURA 21. Número de embriões globulares, formados em calos de *C. arabica* cvs.: Tupi e Catucaí Amarelo, em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número de Embriões Torpedos

A influência das cultivares no número de embriões torpedos pode ser observada na Figura 22. As cultivares Obatã, Tupi, Catucaís Vermelho e Amarelo apresentaram formação de maior número de embriões por explante, quando comparadas à cultivar Katipó. Esta diferença de comportamento entre as cultivares provavelmente está relacionada a fatores genéticos, concordando com Cordeiro (1999) e Zamarripa (1993), que têm verificado que a competência para embriogênese somática indireta varia inter e intraespecificamente (Berthouly e Michaux-Fierrere, 1996; Bieysse, Gofflot e Michaux-Ferriere (1993).

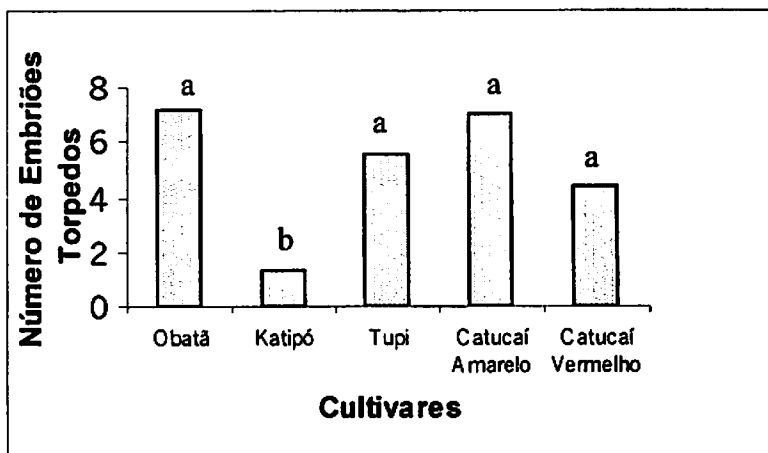
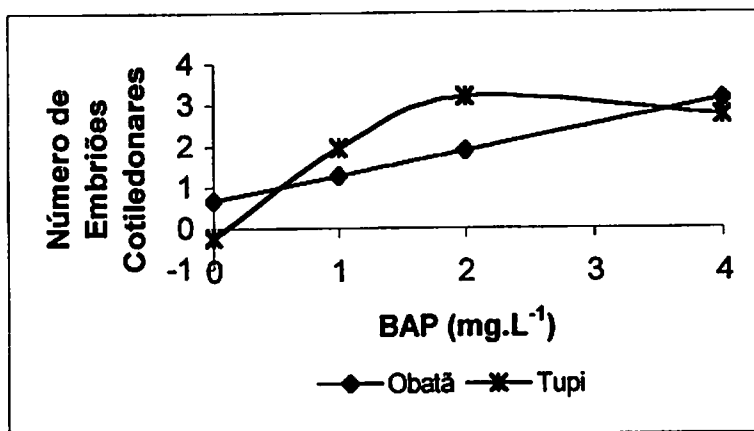


FIGURA 22. Número de embriões torpedos, formados em calos de *C. arabica* cvs.: Obatã, Katipó, Tupi e Catucaís Amarelo e Vermelho. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número de Embriões Cotiledonares

Analisando a Figura 23, pode-se verificar o comportamento distinto entre as cultivares Obatã e Tupi. A maior formação de embriões cotiledonares para a cultivar Tupi ocorreu quando foram adicionados ao meio de cultura 2,5 mg.L⁻¹ de BAP. Para a cultivar Obatã a diferenciação de embriões cotiledonares se elevou à medida que as concentrações de BAP aumentaram.

Neste experimento, verifica-se, de um modo geral, que os embriões somáticos foram formados a partir de calos embriogênicos tendo como explantes primários folhas de partes aéreas micropropagadas. Segundo Cordeiro (1999), os CE's são calos primários contendo até 20 embriões somáticos por explante, concordando com os resultados apresentados.



$$Y_{\text{Obatã}} = 0,67 + 0,62X$$

$$R^2 = 0,92$$

$$Y_{\text{Tupi}} = -0,24 + 2,68X - 0,48X^2$$

$$R^2 = 0,91$$

FIGURA 23. Número de embriões cotiledonares, formados em calos de *C. arabica* cvs.: Obatã e Tupi, em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

5 CONCLUSÕES

As cultivares de *C. arabica* reagem favoravelmente e de maneira distinta à embriogênese somática.

A ação combinada entre 2,4-D e Cinetina é necessária para indução de calos primários mistos.

Os explantes foliares provenientes de plantas da cultivar Obatã, cultivadas em condições de campo, induzem:

- maior diferenciação de calos embriogênicos friáveis quando se utiliza BAP (8mg.L^{-1}) associado ou não com 2,4-D;
- maior formação de embriões a partir de calos embriogênicos friáveis, em meio de cultura acrescido BAP e sacarose.

Os explantes foliares oriundos de partes aéreas micropropagadas das cultivares Obatã, Katipó, Tupi e Catucaís Vermelho e Amarelo, induzem:

- comportamento distinto entre as cultivares;
- maior diferenciação dos calos em calos embriogênicos, para as cultivares Tupi e Catucaí Vermelho, com adição de 2 mg.L^{-1} de 2,4-D em meio de cultura;
- formação de baixo número de embriões/explante;
- maior número de embriões formados para as cultivares Tupi, Catucaí Amarelo e Obatã.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.A.S.; SIMIONI, K.C.; FAZUOLI, L.C.; RAMOS, L.C.S. Indução de calos de explantes foliares de genótipos de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. Resumos... Poços de Caldas: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v.1, p.145-147.
- ANDRADE, L.M.da C. Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Lavras: UFLA, 1998. 86p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- 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.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Somatic embryogenesis of coffee (ed). In: SERA, T.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. *Coffe Biotechnology and Quality*. Londrina: SIBAC, 2000. v.1, p.71-90.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.44, n.2, p.169-176, Feb. 1996.
- BETTENCOURT, A.J.; CARVALHO, A. Melhoramento visando resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia*, Campinas, v.27, n.4, p.35-68, fev. 1968.
- BIEYSSE, C.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.71, n.11, p.1496-1502, Nov. 1993.
- BOXTEL, 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.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). *Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.2. p.87-132.

- CALIGARI, P.D.S.; SHOHET, S. Variability in somatic embryos. In: REDENBAUGH, K. (eds). *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. Boca Raton, FI: CRC Press, 1993. p.163-174.
- CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. Melhoramento visando resistência do cafeeiro à ferrugem alaranjada. *Ciência e Cultura*, São Paulo, n.23, v.2, p.141-146, fev. 1971.
- CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. Natural cross-pollination in *Coffea arabica* L. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 16., 1962, Brussels. *Proceedings...* Brussels, 1962. v.4, p.447-449.
- CARVALHO, F.J.P.C.; CARVALHO, P.C.T.; CRÓCOMO, O.J. Cultura de tecidos de explantes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 2., 1974, Poços de Caldas. *Resumos...* Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1974. p.299-300.
- CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la region malgache – Mascarocoffea Leurs relation avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). *Memoires Orstom*, Paris, v.87, p.87-223, 1978.
- CORDEIRO, A.T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. Viçosa: UFV, 1999. 11p. (Tese – Doutorado em Fisiologia Vegetal).
- COSTA, W.M. Relação entre grau de resistência à *Hemileia vastatrix* e a produtividade do café Icatú. *Bragantia*, Campinas, v.37, n.4, p. 1-9, mar. 1978.
- COSTA, W.M.; ESKEES, A.B.; RIBEIRO, I.J.A. Avaliação do nível de resistência à *Hemileia vastatrix*. *Bragantia*, Campinas, p. 23-29, fev. 1978. nota n.4.
- 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.
- DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R.; BOTELHO, S.A. **Propagação de espécies florestais**. Lavras: UFLA, 1995. 41p.

- 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.
- DUBLIN, P. Embryogenesis somatique directe sur fragments de feuilles de cafiier Arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.25, n.4, p.237-241, oct./dec. 1981.
- DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N.M.; MROGINSKI, L.A. (eds). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos e Aplicaciones**. Turrialba, Costa Rica, 1991. p.612-642.
- DUBLIN, P. Multiplication vegetative in vitro de l'arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.24, n.4, p.281-290, oct./dec. 1980.
- DUBLIN, P. Tequiniques de reproduction végétative "in vitro" et amelioration génétique chez les caféiers cultives. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.28, n.4, p.231-244, oct./dec. 1984.
- DUSSERT, S; VERDEIL, J.L.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. **Plant Science**, Limerick, v.111, n.2, p.229-236, Nov. 1995.
- ESKES, A.B. Resistência horizontal do cafeeiro à *Hamileia vastatrix* Berk et Br. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 1979, Campinas. **Anais...** Campinas: Summa Phytopatologica, 1979. p.18-19.
- GARCIA, E.; MENENDEZ, A. Embryogénesis somática a partir de explantes foliares Del cafeto Catimor. **Café, Cacao e Thé**, Paris, v.31, n.1, p.15-22, jan./mar. 1987.
- GRANER, E.A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1967. p.320.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogénesis somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. p.533-568.
- 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.

- KONAR, R.N.; NAKARAJA, K. Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus sceleratus* L. *in vitro*. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.18, p. 680-699, 1969.
- 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.
- MAGNAVAL, C.; NOIROT, M.; VERDEIL, J.L.; BLATTES, A.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; BEULÉ, T.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.150, n.9, p.719-728, Sept. 1997.
- MATSUDA, K.; KIKIUTA, Y.; OKAZAWA, Y. A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. **Journal of Agriculture**, Hokkaido, v.60, n.9, p.183-193, 1981.
- MELO, B.; BARTHOLO, G.F.; MENDES, A.N.G. Café: variedades e cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.193, p.92-96, 1998.
- MENDES, A.N.G. Economia cafeeira: o agrubusiness. In: MENDES, A.N.G.; GUIMARÃES, R.J. (eds) **Cafeicultura empresarial – produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v. 1, p.1-59.
- MENDES, A.N.G. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: MENDES, A.N.G.; GUIMARÃES, R.J. (eds) **Cafeicultura empresarial – produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. v.1, p.1-98.
- MONTEIRO-HARA, A.C.B.A. **Cultivo in vitro de três espécies do gênero *Passiflora***. Piracicaba: ESALQ, 2000. 82p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, Mar. 1962.
- NORIEGA, C.; SONDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embriogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p.73-81.

- OWUOR, J.B.O. *In vitro* initiation of arabusta coffee hybrids. **Kenya Coffee**, Nairobi, v.52, n.1, p.59-62, Jan. 1987.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. v.1, p.71.
- PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, N.S. Melhoramento Genético do cafeeiro visando resistência às doenças. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. p.117-140.
- PIERSON, 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.
- PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v.1, p.26-37, 1995.
- RIBEIRO, L.S. **Cultura in vitro de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Lavras: UFLA, 2001. 73p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- RIBEIRO, M.T.F.; MEZZOMO, C.P.L.; DUARTE, L.H.; FENELON, A.N. **Tradição e moderno se combinam na definição de uma nova trajetória em busca da competitividade: o caso da cadeia agroalimentar do café no sul de Minas Gerais**. In: Desafios e potencialidades da agricultura no sul de Minas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. p.1-17.
- SANTOS, A.C.P.; CORDEIRO, A.T.; CAMPOS, R.C.; OTONI, W.C.; ZAMBOLIM, L. Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: EMBRAPA/CAFÉ, 2000. v.1, p.156-159.
- SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CRÓCOMO, O.J.; MONACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, Buenos Aires, v.31, n.2, p.67-74, 1973.
- SHARP, W.R.; SONDAHL,M.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology on in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.

- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* (Biological action of growth substances). **Symposium of the Society Experimental Biology**, v.11, p.116-131, 1957.
- SONDAHL, M.R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogenese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 6., 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1978. p.67.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.R. Coffee. In: AMMYRATO MCMILLEN, (eds). **Handbook of Plant Cell Culture**. New York, 1984. p.564-590.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation in vitro Del café. In: ROCA, W.R.; MROGINSKI, L.A. (eds). **Cultivo de tejidos em la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba, 1991. p.621-642.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P.; HOLLAENDER, A. (eds). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum, 1985. p.215-232.
- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultura leaf explant of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, Zurik, v.81, n.4, p.395-408, 1977.
- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. Research in *Coffea* spp and applications of tissue culture methods. In: SHARP, W.; LARSEN, P.D.; PADDOCK, E.F.; RAGHAVAN, V. (eds). **Plant Cell and Tissue Culture – principles and applications**. Columbus: Ohio State University Press, 1979. p.527-584.
- 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 coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.19, n.4, p.509-514, Aug. 1970.
- TAHARA, M.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Formation of somatic embryos from protoplast of *Coffea arabica* L. **Hortscience**, Alexandria, v.29, n.3, p. 172-174, Mar. 1994.

- THORPE, A.T.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, J.K. (ed.). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant**. Orlando: Thorpe e Pastel, 1984. p.49-60.
- TISSERAT, B.; ESAN, B.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Review**, New York, v.1, p.1-78, 1979.
- VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p.101-103.
- VON ARNOLDS, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.59, n.5, p.870-874, May 1981.
- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as na embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v.57, n.3, p.443-462, Mar. 1986.
- YASUDA, T.; TAHARA, M.; HATANAKA, T.; NISHIBATA, T.; YAMAGUCHI, T. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. In: COLLOQUE DE L'ASSOCIATION SCIENTIFIQUE INTERNATIONALE DU CAFÉ (ASIC), 16., 1995, Kyoto. **Annales... Kyoto**, 1995. v.2, p.537-541.
- ZAMARRIPA, A. **Etude et développement de l'embryogenèse somatique en milieu liquide du caféier (*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et l'hibryde Arabusta)**. Rennes, França: Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 1993. 191p. (Tese de Doutorado).
- ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café, Cacao e Thé**, Paris, v.35, n.4, p.233-244, oct./dec. 1991.