

**DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES E
PLÂNTULAS DE *Coffea arabica* L. ORIUNDAS
DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA**

JULIANA COSTA DE REZENDE

2005

JULIANA COSTA DE REZENDE

**DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES E PLÂNTULAS
DE *Coffea arabica* L. ORIUNDAS DE EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DIRETA**

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

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

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

Rezende, Juliana Costa de

Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de embriogênese somática direta / Juliana Costa de Rezende. -- Lavras : UFLA, 2005.

57 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Café. 2. *Coffea arabica*. 3. Embriogênese somática direta. 4. Meios de Cultura. 5. Reguladores de crescimento. 6. Aclimatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.7323

JULIANA COSTA DE REZENDE

**DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES E PLÂNTULAS
DE *Coffea arabica* L. ORIUNDAS DE EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DIRETA**

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

APROVADA em 19 de outubro de 2005.

Prof. Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes UFLA

Dr. Élderis Pereira Botrel EPAMIG

Prof. Dr. Moacir Pasqual.

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, por iluminar todos os meus caminhos.

OFEREÇO.

Aos meus pais, José Maria e Josélia.

À minha irmã, Ana Cristina.

Ao meu namorado, Adriano.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Moacir Pasqual, por toda atenção, amizade e conselhos oferecidos durante estes anos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Antônio Nazareno Guimarães Mendes e Prof. Dr. Élberis Pereira Botrel, pelo apoio e amizade, desde os tempos de graduação.

Aos professores Samuel Pereira de Carvalho e Rubens José Guimarães, pela atenção e por todos os conhecimentos transmitidos.

A professora Adriana, pela colaboração.

Aos funcionários Vantuil, Claret, Evaldo, Antônio Carlos, Marli, Neuzi, D. Arlete, Marilza e Marcinho, por todo auxílio dado e pela simpatia sempre constante.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial às grandes amigas Alba, Ester e Flávia, por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

A todos os colegas do Setor de Cafeicultura.

Aos colegas de graduação Cristiane, Fernanda, Marcela, Neiva, Pefa e Zecão, pelo companheirismo durante todos esses anos.

Ao meu namorado, Adriano, por estar presente em minha vida de maneira muito forte, me ajudando em todas as conquistas.

Aos meus pais, à Ana Cristina e ao Flávio, que em momento algum deixaram de acreditar em mim, e investiram nos meus sonhos para torná-los realidade.

Aos meus tios, minhas primas, avós e a Ruth, por todo amor e encorajamento, pelo ambiente familiar que me foi proporcionado.

A Marise e Ednaldo, pelo carinho, minha gratidão.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 O cafeeiro.....	3
2.2 Importância econômica.....	5
2.3 Cultivares melhoradas de <i>Coffea arabica</i> L.....	6
2.4. Cultivar Rubi	7
2.5 Cultura de Tecidos Vegetais.....	8
2.6 Embriogênese Somática.....	11
2.7 Aclimatização.....	18
2.8 Substrato.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 ETAPA 1 – Indução e desenvolvimento de embriões somáticos.....	22
NH ₄ NO ₃ x KNO ₃	22
Sacarose x GA ₃	22
3.3 ETAPA 2 – Desenvolvimento e aclimatização de plântulas.....	24
Ágar x meios de cultura.....	25
ANA x GA ₃	25
Substrato x fertilizante de liberação lenta.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Desenvolvimento de embriões somáticos.	
4.1.1 NH ₄ NO ₃ x KNO ₃	27
4.1.2 Sacarose x GA ₃	32
4.2 Desenvolvimento de plântulas	
4.2.1 Ágar x meios de cultura.....	34
4.2.2 ANA x GA ₃	40

4.3 Aclimatização de Plântulas	
4.3.1 Substrato x fertilizante de liberação lenta.....	43
5 CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

REZENDE, Juliana Costa de. **Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de embriogênese somática direta.** 2005. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O melhoramento genético do cafeeiro tem incorporado por meio de cruzamentos, ganhos genéticos para produtividade e outras características de interesse agrônomo. A introdução de métodos biotecnológicos para auxiliar os programas de melhoramento genético tem se mostrado bastante útil, principalmente em culturas perenes, como é o caso do cafeeiro. Um importante método de propagação *in vitro* de plantas de *Coffea* é a embriogênese somática. Diante dos fatos, objetivou-se, com este trabalho, desenvolver embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Rubi provenientes de embriogênese somática direta. No desenvolvimento de embriões somáticos, avaliou-se a influência de NH_4NO_3 (0%; 25%; 50%; 75 e 100%) x KNO_3 (0%; 25%; 50%; 75% e 100%) e a influência de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60mg.L^{-1}) x GA_3 (0; 2,5; 5 e 10mg.L^{-1}). No desenvolvimento de plântulas, avaliou-se a influência de diferentes tipos de meio (MS; Knudson; WPM; White) x ágar (0; 2; 4; 6 e 8g.L^{-1}) e a influência de GA_3 (0; 2,5; 5; 10mg.L^{-1}) x ANA (0; 0,25; 0,5; 1; 2mg.L^{-1}). Os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento com irradiância em torno de $32\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As variáveis avaliadas foram: número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca da parte aérea. Na etapa de aclimatização de plântulas, foram testados dois tipos de substrato (Plantmax ® e Plantmax ® mais casca de arroz carbonizada (50%)) x fertilizante de liberação lenta (0, 0,5, 1 e 2g do fertilizante por célula). Os resultados indicaram que é possível a obtenção de plântulas micropropagadas de *Coffea arabica* L. cultivar Rubi via embriogênese somática direta. Para o desenvolvimento de embriões somáticos, a utilização de 50% de NH_4NO_3 e KNO_3 é eficiente na indução de folhas. A ausência destes sais proporcionou o melhor peso e a utilização de 6mg.L^{-1} de GA_3 proporcionou melhor desenvolvimento no comprimento da parte aérea. Para o desenvolvimento de plântulas de cafeeiro, o meio WPM, a utilização de 10mg.L^{-1} de GA_3 e 1mg.L^{-1} de ANA apresentaram maior eficiência. A concentração de $1,5\text{mg.L}^{-1}$ de ágar proporcionou maior número de folhas e comprimento da parte aérea. O maior peso foi obtido na ausência de ágar.

* Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Samuel Pereira de Carvalho - UFLA

ABSTRACT

REZENDE, Juliana Costa de. **Development of embryos and plantlets of *Coffea arabica* L. from direct Somatic Embryogenesis.** 2005. 57 p. Dissertation (Master of Science in Agronomy/Crop Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Coffee breeding programs have incorporated, by means of artificial crossings, genetic benefits for productivity and other characteristics of agronomic interest. The introduction of biotechnology methods to aid genetic breeding programs has demonstrated to be very much useful, mainly in perennial cultures, as it is the case with the coffee species. An important method of *in vitro* propagation of *Coffea* plants is somatic embryogenesis. Therefore, this work aimed the development of embryos and plantlets of *Coffea arabica* L. cv. Rubi from direct somatic embryogenesis. The influence of NH_4NO_3 (0%; 25%; 50%; 75% and 100%) x KNO_3 (0%; 25%; 50%; 75% and 100%) as well as sucrose (0; 15; 30; 45 and 60mg.L⁻¹) x GA_3 (0; 2,5; 5 and 10mg.L⁻¹) were tested for the development of somatic embryos in a diverse set of combinations of these media components. To achieve the most adequate cultura medium formulation for the plantlets development, it was evaluated the influence of different types of culture media (MS; Knudson; WPM; White) x agar (0; 2; 4; 6 and 8g L⁻¹) and the influence of GA_3 (0; 2,5; 5; 10mg.L⁻¹) x NAA (0; 0,25; 0,5; 1; 2mg L⁻¹) over the development of the young formed embryos. The experiments were maintained in a growth room under light intensity of $32\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ± 25 °C photoperiods of 16 hours. The characteristics evaluated were: number of leaves, length of the aerial part and fresh mass of the plantlets. For the plantlets acclimatization process two substrate types were tested (Plantmax ® and Plantmax ® carbonized rice husk (50%)) x slow liberation fertilizer (0, 0,5, 1 and 2g of the fertilizer per cell). The results indicated that it is possible to obtain of micropropagated plantlets of *Coffea arabica* L. cv. Rubi by direct somatic embryogenesis. For the development of somatic embryos, the use of 50% of NH_4NO_3 and KNO_3 is efficient for the leaves induction. The absence of these salts provided the best weight of the plantlets. The use of 6mg L⁻¹ of GA_3 provided the best development in terms of length of the aerial part. In order to obtain coffee tree plantlets with high efficiency the WPM culture medium with 10mg L⁻¹ of GA_3 and 1mg L⁻¹ of NAA presented the best results. The concentration of 1,5mg L⁻¹ of agar provided the largest number of leaves as well as the biggest length of the aerial part.

* Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Samuel Pereira de Carvalho - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O café sempre teve grande importância para a economia brasileira, contribuindo de maneira decisiva para a industrialização do país, graças ao capital reunido com as exportações do produto. O país é o maior produtor com 38 milhões de sacas em 2004 e o segundo maior consumidor mundial de café, com 14,496 milhões de sacas processadas neste mesmo ano. Além disso, a cafeicultura também proporciona milhões de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia produtiva, exercendo importante papel social no campo.

Neste contexto, o amplo desenvolvimento científico e tecnológico da cafeicultura convencional do século XX vem assegurando alta produtividade e lucratividade. O melhoramento genético do cafeeiro tem contribuído de maneira decisiva para este desenvolvimento, incorporando, por meio de cruzamentos, ganhos genéticos para produtividade e outras características de interesse agrônomo. O sucesso dos programas de melhoramento genético tem colocado à disposição dos cafeicultores cultivares mais adaptadas, produtivas e que atendem às necessidades dos consumidores.

Durante o processo de obtenção de cultivares de cafeeiro utilizando as metodologias convencionais de melhoramento, um ciclo de seleção pode levar até quatro anos, considerado da obtenção de sementes até o florescimento das plantas e, novamente, a obtenção de sementes. Além disso, para obter dados consistentes, a avaliação de características relacionadas à produtividade somente é realizada em plantas com 6-8 anos de idade (Vieira & Kobayashi, 2000).

Assim, considerando-se que, a partir do cruzamento inicial, vários ciclos de seleção são necessários para encontrar genótipos de cafeeiro com características desejáveis do ponto de vista agrônomo, um programa convencional de melhoramento pode demorar até trinta anos para obter novas cultivares. Além de ser um processo demorado e trabalhoso, a eficiência da

seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa, devido, principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas para propagação acelerada de plantas de cafeeiro é fundamental para aumentar a taxa de multiplicação e possibilitar a rápida difusão de novas cultivares.

A introdução de métodos biotecnológicos para auxiliar os programas de melhoramento genético tem se mostrado bastante útil, principalmente em culturas perenes, como é o caso do cafeeiro. Um importante método de propagação *in vitro* de plantas de *Coffea arabica* é a embriogênese somática, que consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas haplóides ou diplóides, sem que haja fusão de gametas e possibilitaria propagação vegetativa acelerada e uniformidade genética de clones superiores, apresentando um grande potencial a ser explorado.

Entretanto, a inexistência de uma metodologia bem definida para *Coffea arabica* tem sido a maior restrição ao emprego da propagação vegetativa *in vitro*, como estratégia para o uso de híbridos de café obtidos pelo melhoramento genético. Essa dificuldade no estabelecimento de um protocolo está relacionada à dificuldade de micropropagação de plantas da espécie.

Alguns protocolos de embriogênese somática já foram estabelecidos para esta espécie, porém, os resultados apresentados na literatura até o presente momento não permitem ainda, que se estabeleça uma metodologia que viabilize a aplicabilidade da propagação vegetativa em escala comercial, ficando clara a necessidade de pesquisas que visem aglutinar as informações até então obtidas, de modo a solucionar esta questão. Diante dos fatos, objetivou-se, com este trabalho, desenvolver embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Rubi provenientes de embriogênese somática direta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro

Dentro do gênero *Coffea* existem duas espécies comercialmente importantes: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Cerca de 70% dos plantios comerciais mundiais são do tipo arábica, principalmente pela qualidade superior de sua bebida. É, sem dúvida, a espécie mais importante do gênero. Trata-se de um arbusto polimorfo, havendo numerosas variedades e cultivares nos países produtores. O arbusto pode atingir 4 metros ou mais de altura e apresenta sistema radicular profundo e amplamente ramificado nas primeiras camadas do solo. Os ramos primários são longos e flexíveis, apresentando abundante ramificação secundária e terciária (Guimarães et al., 2002).

As folhas do cafeeiro são opostas, inteiras, coriáceas e persistentes (na maioria das espécies), tendo coloração verde mais escura e brilhante na parte superior do limbo e mais clara e opaca, com nervuras mais salientes na parte inferior. Nos ramos laterais e nas axilas das folhas são formadas gemas florais, que dão origem à floração e à frutificação. As flores são normalmente brancas, podendo ser amareladas e rosa-claro; são tubulosas, com a parte livre da corola dividida em um número variável de lóbulos e apresentando cinco pétalas em *Coffea arabica* L. As flores são andrógenas, crescem em glomérulos (rosetas) e abrem-se oito a dez dias após a chuva ou irrigação, tendo duração efêmera. O fruto de café é uma drupa, normalmente com duas sementes, que são plano-convexas (sementes chatas), desde que não haja abortamento de um lóculo, formando-se, nesse caso, sementes arredondadas, chamadas de moca. O sistema radicular é pivotante, as raízes finas são superficiais, localizando-se, em sua maioria (70%), até 30 a 40 centímetros de profundidade do solo (Matiello, 1991). Rápido crescimento vegetativo e desenvolvimento dos frutos parecem

ocorrer em momentos diferentes, o que sugere uma possível oposição ou competição entre eles (Mayne, 1944; Trojer, 1956).

Coffea arabica é uma espécie alotetraplóide, com $2n = 4x = 44$ cromossomos, e apresenta comportamento cromossômico semelhante ao das espécies diplóides. A taxa de fecundação cruzada é de aproximadamente 10%, o que é considerado, no melhoramento genético, como espécie autógama (Ramalho, 1999). Por essa razão, a metodologia de melhoramento do *Coffea arabica* é a aplicada geralmente nas espécies autógamas, tendo por base a obtenção de linhagens puras por seleção genealógica depois da recombinação de caracteres aportados pelos pais (Berthouly, 2000). Enquanto o café arábica é autocompatível, a maioria, senão todas as espécies de café, é auto-incompatível (Krug, 1945; Mendes, 1949).

Comportando-se como planta predominantemente autógama, o cafeeiro arábica não manifesta efeito desfavorável das autofecundações sucessivas sobre o vigor e a produtividade das plantas. Por este motivo, os materiais comerciais de *C. arabica* são geralmente linhagens ou progênies autofecundadas em gerações mais avançadas, muito uniformes quanto à expressão dos caracteres agronômicos, gerando lavouras nas quais o padrão de uniformidade é muito elevado (Mendes, 1999). Para a maioria dos caracteres de interesse, o fenótipo favorável parece ser controlado pelo alelo dominante.

Essa observação é particularmente importante quando o interesse é utilizar plantas F1 em escala comercial e somente seria possível pela propagação vegetativa "*in vivo*" ou "*in vitro*", o que vem sendo exaustivamente tentado pela pesquisa cafeeira. Em *C. arabica* L. ocorrem plantas macho-estéreis, numa frequência muito baixa, o que pode tornar-se interessante no futuro para a produção de sementes híbridas (Guimarães et al., 2002).

2.2 Importância econômica

O Brasil tem a liderança absoluta da produção de café no mundo, com média de 30% do total. As dimensões geográficas continentais e o clima tropical favorável ao cultivo da espécie facilitaram a adaptação da planta em solo brasileiro, motivo pelo qual ela é produzida com excelente qualidade de Norte a Sul, de Rondônia ao Paraná.

O café é cultivado em treze estados brasileiros, mas 95% da produção se concentram em apenas seis: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia. Na safra 2004/05, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a área ocupada com café somou 2,416 milhões de hectares, com 5,89 bilhões de plantas. A atividade envolve cerca de 300.000 cafeicultores e emprega direta e indiretamente oito milhões de pessoas (Anuário Brasileiro do Café, 2005).

De acordo com esta mesma fonte, apesar do café estar presente em Minas Gerais desde o início do século XX, foi a partir de meados dos anos 1980 que o Estado começou a despontar como maior produtor do Brasil. Conforme dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (Emater), a atividade esta presente em 690 municípios, com mais de 90.000 propriedades.

O Sul de Minas Gerais é a principal e mais tradicional região cafeeira do estado. Caracteriza-se por pequenas propriedades, com lavouras de 12 hectares, em média. É intenso o uso de mecanização nos locais onde a topografia permite. As áreas montanhosas, sujeitas a geadas moderadas, dividem espaço com terrenos de desníveis mais suaves. Caracteriza-se também por temperatura amena e capacidade de produzir um café de excelente qualidade de bebida (Ribeiro et al., 1998).

2.3 Cultivares melhoradas de *Coffea arabica* L.

O Brasil é o país que soma o maior número de contribuições ao melhoramento genético do cafeeiro. Desde o início da década de 1930, a Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) vem desenvolvendo um vasto programa de genética e melhoramento do cafeeiro. O país vem realizando estudos de genética do café e lançando as mais importantes cultivares plantadas nas várias regiões cafeeiras do Brasil e mesmo de outros países (Guimarães et al., 2002). Certamente, em poucas culturas de importância econômica foram obtidos tantos ganhos através do melhoramento genético como no cafeeiro (Mendes, 1999).

De acordo ainda com Mendes (1999), apenas com a seleção e a hibridação de plantas superiores conseguiu-se quadruplicar a produtividade de grãos dos nossas cultivares de cafeeiro. O aumento do potencial de produtividade da maioria das espécies agrônomicas vem ocorrendo de forma consistente por meio da expansão da diversidade de procedimentos científicos utilizados no melhoramento de plantas, como o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos (Figueira, 2005).

Nas décadas de 1940 e 1950, com a seleção da cultivar Mundo Novo (em lavoura comercial, como produto de um provável cruzamento entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho) e, posteriormente, nas décadas de 1950 e 1960, com a obtenção da cultivar Catuaí (por meio da hibridação artificial entre as cultivares Mundo Novo e Caturra Amarelo), verificou-se um salto na cafeicultura brasileira. Com a renovação das lavouras, no final dos anos 1960 e início da década de 1970, praticamente todo o parque cafeeiro brasileiro passou a ser constituído por linhagens selecionadas nas cultivares Mundo Novo e Catuaí, dando mostras da efetiva aceitação desses materiais pelos cafeicultores (Ribeiro, 2001).

Apesar de ainda encontrarem-se poucas lavouras formadas com cultivares mais antigas, particularmente ‘Bourbon Amarelo’ e ‘Bourbon Vermelho’, a cafeicultura brasileira é hoje constituída basicamente por linhagens das cultivares Mundo Novo, Catuaí e, mais recentemente, em áreas ainda pouco expressivas, ‘Icatu’ e ‘Rubi’ (Mendes, 1998).

2.4 Cultivar Rubi

O cafeeiro Rubi é oriundo da hibridação entre ‘Mundo Novo’ e o ‘Catuaí’, efetuada no IAC. O híbrido resultante H 5010 foi introduzido e selecionado em Minas Gerais pela EPAMIG e UFLA, sendo liberado para plantio a partir de 1995 com o nome de ‘Rubi’. As plantas de ‘Rubi’ têm broto bronze e verde, com predominância dos primeiros e apresentam susceptibilidade à ferrugem (Matiello et al., 2002).

O material selecionado e lançado em Minas Gerais possui porte baixo, com altura por volta de 2,0 metros e diâmetro médio de copa de 1,8m (aos sete anos e meio). Tem excelente produtividade e elevado vigor vegetativo, não exibindo depauperamento precoce após elevadas produções. O número de ramificações secundárias é abundante e os frutos são de coloração vermelha (Guimarães et al., 2002).

Vários materiais foram obtidos, sendo o trabalho inicial realizado pelo IAC, nas décadas de 1960 e 1970. Posteriormente, com a introdução desse material em Minas Gerais pelo Sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG-UFLA-UFV), novos retrocruzamentos foram realizados e a seleção intensificada. A avaliação preliminar das populações que deram origem à cultivar Rubi evidenciou o potencial produtivo dessas progênies, sendo as seleções de prefixo MG-1190 e MG-1192 as mais avançadas e mais indicadas para plantio em escala comercial.

2.5 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos utiliza-se de técnicas por meio das quais pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, designados explantes, são retirados de plantas de genótipos interessantes e cultivados em meio nutritivo, em condições assépticas. Os fragmentos podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, de onde se originam calos que, pelo uso de hormônios vegetais adicionados ao meio, podem se diferenciar em raízes, brotos e, enfim, produzir uma planta inteira “*in vitro*”. É considerada uma técnica de relevada importância, pois permite a propagação rápida, de culturas de ciclo longo, como *C. arabica*. Visa obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser: meristema, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Baseia-se na totipotencialidade celular, ou seja, na capacidade de uma célula regenerar um organismo idêntico àquele que a originou, visto que possui toda a informação genética necessária para isso (Ribeiro, 1999).

As técnicas da biotecnologia e de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. 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 (Carvalho et al., 1974; Bandel et al., 1975; Custer et al., 1980; De Pena, 1983; Söndahl et al., 1984; Thorpe & Patel, 1984; Owuor, 1987; Söndahl et al., 1991; Andrade, 1998; Cordeiro, 1999; Maciel, 2001; Ribeiro, 2001; Pereira, 2005). No Brasil, a primeira referência é de Sharp et al. (1973), mas, desde 1970, Söndahl e colaboradores, no IAC, já estavam pesquisando na área.

Por consistirem parte essencial da cultura de tecidos, os meios de cultura têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. 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 et al., 1998). Eles devem 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 (Pasqual et al., 1998). Daí a importância de se conhecerem detalhes dos componentes e propriedades dos meios de cultura, além da metodologia para seu preparo e os principais meios utilizados (Torres et al., 1998).

Diversas formulações de meio têm sido empregadas na cultura *in vitro*, as quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais. Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes. Um grande passo foi dado em 1962, com a publicação de um trabalho por Murashige & Skoog (1962), que determinaram a concentração de sais, estabelecendo o tão conhecido meio 'MS'. 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; Maciel, 2001; Pereira, 2005).

Usa-se também o meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Lloyd & McCown (1980), o meio básico Knudson (modificado por Arditti, 1967) e o meio básico White (1943), entre outros. O meio White (1943) foi utilizado por muito tempo como meio básico de uma grande variedade de tecidos de diversas espécies. Entretanto, para cada tipo de explante, espécie e cultivar, o meio de cultura mais adequado e eficiente deve ser determinado experimentalmente.

O meio de cultura deve fornecer, além de macro e micronutrientes, que são considerados como essenciais às plantas clorofiladas, os quais são

fornecidos por reagentes químicos de elevada qualidade (Caldas et al., 1998), uma fonte de carboidrato (normalmente a sacarose) para substituir o carbono atmosférico, pois as células, tecidos e plântulas produzidas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. E, para proporcionar um melhor desenvolvimento, devem ser adicionados ao meio alguns componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (Torres et al., 1998).

Em trabalhos com cafeeiro, os meios mais utilizados são básicos, indutores de calos, embriogênese e meio para desenvolvimento do embrião. Os primeiros estudos envolvendo meio de cultura para embriões usaram amplamente a solução de Snop (Andreoli, 1986).

A composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento de explantes de *Coffea arabica* (Moraes Fernandes, 1990). As auxinas e as citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na cultura de tecidos (Skoog & Miller, 1957). Combinações de dosagens dessas substâncias propiciam um melhor crescimento e desenvolvimento do explante.

O ágar é o agente comumente utilizado na solidificação dos meios de cultura (George, 1993; Singha, 1984). George (1993) atribui isto à vantagem de formar um colóide quando adicionado à água, tornando-se líquido a 100°C e solidificando-se a 45°C, mantendo-se estável nas temperaturas de incubação. Além do mais, o ágar não é digerido pelas enzimas vegetais e não reage com os constituintes do meio. Existem diversas marcas comerciais de ágar, porém, recomenda-se minimizá-lo ou procurar otimizá-lo no preparo do meio, visto que o ágar é considerado o componente de custo mais elevado do meio de cultura (Peixoto & Pasqual, 1995; George, 1993; Singha, 1984).

Várias são as metodologias de cultura de tecidos que auxiliam os programas de melhoramento do café, tais como a micropropagação, com o objetivo de realizar a rápida multiplicação do material melhorado e manutenção de bancos de germoplasma; cultura de embriões, para a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e para a antecipação da época de plantio; embriogênese somática, por meio de explantes foliares para obtenção da planta inteira e cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas (Andrade, 1998). A produção de transgênicos, com o uso das técnicas de transformação genética, pode ser de grande interesse para o melhoramento genético de plantas, pois permite gerar novas cultivares diretamente ou genótipos para serem utilizados em um programa de melhoramento convencional (Brasileiro & Dusi, 1999).

A cultura *in vitro* apresenta várias aplicações práticas para o melhoramento de plantas, cabendo ao melhorista avaliar o potencial das técnicas para seu programa e adotar aquelas, dentro de suas limitações de recursos, que contribuem para o aumento da eficiência e da produtividade (Borém, 1998).

2.6 Embriogênese somática

Embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas, pelos estádios embrionários característicos, sem a fusão de gametas (Willians e Maheswaram, 1986). O embrião somático é uma estrutura bipolar independente, desenvolvida a partir da: (1) indução e ativação das células totipotentes, (2) formação de células ou grupo de células embriogênicas, (3) diferenciação bipolar e (4) desenvolvimento do embrião segundo os estádios embrionários característicos, maturação e germinação de maneira similar àquela que ocorre no embrião zigótico (Tisserat & Vandercook, 1985).

A indução de embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica nos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico (Merkle et al., 1995). De acordo com as próprias características morfológicas, anatômicas e funcionais das estruturas formadas, poderá ou não ocorrer diferenciação dos embriões somáticos na fase em que as estruturas embriogênicas se formam.

A implementação deste processo ocorre a partir de explantes de origens diversas, como fragmentos de entrenós (Staritsky, 1970; Dublin, 1980), folhas (Dublin, 1981; De Pena, 1983; Pierson et al., 1983, Yasuda et al., 1985; Zamarripa et al., 1991) e protoplastos derivados de embriões somáticos (Schopke et al., 1987) ou de suspensões celulares (Spiral & Petiard, 1991), destacando-se as folhas por serem mais abundantes e de fácil desinfestação (Dublin, 1991).

O primeiro trabalho relatando a embriogênese somática no gênero *Coffea* foi apresentado em 1970, por Staritsky e ela tem sido documentada por diversos autores (Herman & Hass, 1975; Söndahl e Sharp, 1977; Söndahl, 1978; Dublin, 1980; Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983; Dublin, 1984; Yasuda et al., 1985; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Cordeiro, 1999; Sreenath, 2000; Maciel, 2001; Pereira, 2005).

Söndahl & Sharp (1977) mostraram que a produção de embriões somáticos de explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon segue duas rotas distintas: (1) direta ou embriogênese de baixa frequência (LFSE, do inglês *low frequency somatic embryogenesis*), em que um pequeno número de embriões surge de calos cicatriciais na ausência de proliferação de calos indiferenciados; e (2) indireta ou embriogênese de alta frequência (HFSE, do inglês *high frequency somatic embryogenesis*), que permite grande produção de embriões somáticos mediante a cultura de explantes primeiramente em meio de proliferação de calos

e, em seguida, em meio de indução de calos embriogênicos friáveis (Nakamura et al., 1992).

Na via direta, os embriões somáticos surgem de calo apenas cicatricial, sem passar pela fase de calo indiferenciado. Originam-se, aparentemente, de células embriogênicas pré-determinadas que requerem apenas um regulador de crescimento ou condições favoráveis (Williams & Maheswaran, 1986) ou, alternativamente, síntese de substância indutora ou remoção de substância inibidora (Söndahl et al., 1985) para liberação de atividade mitótica e expressão da embriogênese.

O processo de embriogênese somática indireta requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, processo dependente da ação de reguladores de crescimento, não só para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação de estado embriogênico. Neste aspecto, 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 (Söndahl & Sharp, 1977, citado por Maciel, 2001). Todavia, em cultura líquida, podem produzir cerca de 12.400 embriões de agregados celulares (Noriega & Söndahl, 1993; Van Boxtel & Berthouly, 1996).

Contudo, essas 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 (Dublin, 1981; Yasuda et al., 1985; Hatanaka 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 (Söndahl et al., 1985), que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (Noriega & Söndahl, 1993; Söndahl et al., 1985; Zamarripa et al., 1991).

Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, codiforme, torpedo e cotiledonar (Guerra et al., 1998). O embrião maduro, com raras exceções, é uma estrutura bipolar plenamente desenvolvida, consistindo de um meristema em cada extremidade: a radícula ou primórdio radicular e a plúmula ou primórdio foliar e um dos dois apêndices laterais, os cotilédones (Pasqual & Pinto, 1988).

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 (100-200µm), 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 et al., 1979; Sharp et al., 1980; Vasil, 1982).

Segundo Cordeiro (1999), a embriogênese somática em *Coffea* apresenta tipos distintos de calos durante a fase de indução. Os primeiros trabalhos desenvolvidos na tentativa de eliminar ou diminuir a fase de calo na embriogênese somática do café foram relatados por Staristky & van Hasselt (1980). Estes autores mostraram que a resposta aos reguladores de crescimento utilizados é extremamente dependente da espécie doadora e da origem dos explantes, mas estabeleceram, como regra geral, que altas concentrações de citocinina estimulam o desenvolvimento de embrióides e que auxinas favorecem a formação de calos.

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 (Maciel, 2001).

Especificamente quanto ao processo de embriogênese somática, as auxinas desempenham papel essencial na indução do embrião somático em cultura e no posterior desenvolvimento desse embrião (Zimmerman, 1993). As principais auxinas utilizadas são: ácido indol acético (AIA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4D), ácido indol butírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA) (George, 1993). Clapham (1973) mostrou que, em cereais, altas concentrações de auxinas, como o 2,4-D, são necessárias e que, usualmente, ANA, AIA e citocininas podem ajudar a indução de calos.

A embriogênese somática verificada para as espécies monocotiledôneas milheto (*Pennisetum americana*) (Vasil & Vasil, 1982), milho (*Zea mays*) (Vasil et al., 1984; Vasil & Vasil, 1986) e trigo (*Triticum aestivum*) (Rajyalakshmi et al., 1991) requerem adição de 2,4-D num processo de indução/diferenciação bifásico. Diferentemente, as dicotiledôneas cenoura (*Daucus carota*) (Fujimura & Komamine, 1980; Tsukahara & Komamine, 1997), cacau (*Theobroma cacao*) (Alemanno et al., 1996) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Etienne et al., 1991) requerem a ação exógena de citocinina em uma das fases do processo de indução/diferenciação, além da auxina 2,4-D.

As citocininas atuam na divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico (George & Sherrinton, 1984). As principais citocininas utilizadas são: 6- benzilaminopurina (BAP), N-isopentilaminopurina (2ip), e zeatina (*Zea*) (George, 1993).

Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. Há evidências de que o efeito das giberelinas é dependente da idade dos embriões e do sítio de absorção do hormônio (Raghavan & Torrey, 1964).

As giberelinas possuem um efeito notável no alongamento do caule primário e esse efeito em tecidos e no centro de crescimento (meristemas) é caracterizado por um aumento no tamanho das células, ou alta taxa de divisão celular, ou ambas (Nickell, 1982). Em alguns casos, o ácido giberélico teria sido usado para a conversão de embriões somáticos em plantas (Guerra et al., 1998). Pereira (2005), trabalhando com embriões somáticos diretos de *C. arabica* L. cv. Rubi obteve melhores resultados para comprimento da parte aérea com a utilização de $14,2\text{mg.L}^{-1}$ de GA_3 e Cavalcante-Alves et al. (1999), trabalhando com *C. arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, por meio da cultura de gemas ortotrópicas, obteve em maior número brotos maiores que 1cm em presença de 9mg.L^{-1} de BAP adicionado de $20,0\text{mg.L}^{-1}$ de GA_3 .

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 et. al., 1998).

Os embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose, entre 12% e 18% (Caldas et al., 1998). O número máximo de embriões formados em cultura de células de *Ranunculus* (erva ciática) foi obtido em meio de cultura com até 2% de sacarose; a concentração de 5% deste açúcar inibia ligeiramente este processo (Konar &

Nakaraja, 1969). Matsuda et al. (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. Em *Citrus*, concentrações ótimas podem variar de 2% a 7%, de acordo com o tipo de explante (Navarro et al., 1985).

Diferentes composições de meio, no que se refere aos reguladores de crescimento (Bieysse et al., 1993) e estádios de maturação do explante (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996), alteram a recalcitrância da embriogênese somática e sugerem que uma maior expressão da competência de um determinado genótipo para esta via de propagação pode requerer condições experimentais particulares.

Embora a maioria dos trabalhos em micropropagação de café por meio da embriogênese somática utilize a estratégia de embriogênese indireta, combinando auxinas e citocininas em um sistema bifásico para induzir primeiramente a calogênese e, em seguida, a embriogênese, este sistema requer um longo período para a obtenção de plantas regeneradas. Em multiplicação clonal, a existência de uma longa fase para produção de calos indiferenciados no processo de embriogênese é considerada indesejável em virtude da maior probabilidade de ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas (Pereira, 2005). Dublin (1981) também levantou a possibilidade de que a propagação de café via embriogênese somática direta pode manter melhor a estabilidade do genótipo doador.

Muitos genótipos de espécies do gênero *Coffea* ainda são de difícil regeneração em cultura de tecidos, apesar dos grandes avanços obtidos nos protocolos de indução de células embriogênicas (Berthouly & Etienne, 1999). Portanto, para a utilização industrial, pesquisas ainda são necessárias para desenvolver protocolos de embriogênese somática, que permitam aumentar a

amplitude de genótipos capazes de produzir, em alta frequência, embriões somáticos de café via embriogênese direta.

2.7 Aclimatização

A aclimatização das plântulas micropropagadas consiste na retirada e transferência dessas do meio de cultivo *in vitro* para outro tipo de substrato e ambiente, com o objetivo de promover uma adaptação gradativa (Moreira, 2001). Este processo representa uma etapa importante dentro de um programa no qual se trabalha com cultura de tecidos. Em alguns casos, chega a ser um fator limitante no processo de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1990).

As folhas de plantas micropropagadas apresentam pouca quantidade de ceras epicuticulares, cutícula mais fina e baixa funcionalidade dos estômatos sob condições de baixa umidade relativa do ar (Sutter, 1998). As raízes são, de modo geral, quebradiças, pouco funcionais na absorção de água e nutrientes e, freqüentemente, morrem ao serem transferidas para o solo, já que há poucas conexões vasculares entre raízes e brotações (George, 1996).

O fenótipo das plantas que crescem *in vitro* é caracterizado por apresentar caules mais curtos e delgados, redução de tecidos de suporte, incremento do conteúdo de água nas células, pequena capacidade fotossintética e estômatos com baixa funcionalidade (Denng & Donnelly, 1993) As plantas micropropagadas têm, em geral, um mecanismo heterotrófico em relação à fonte de carbono (Pasqual, 2000).

2.8 Substrato

O processo de aclimatização é crucial para a obtenção de mudas de alta qualidade, provenientes da cultura de tecidos. A otimização do processo de aclimatização envolve suprimento adequado de nutrientes, uso de substratos

adequados, utilização de substâncias reguladoras de crescimento, controle do ambiente de cultivo, entre outros cuidados (Catunda, 2004).

Nesse sentido, deve-se encontrar um substrato que seja uniforme em sua composição, rico em nutrientes, apresentando elevada capacidade de retenção de água e troca catiônica, ser isento de pragas, patógenos e sementes de plantas daninhas e, ainda, ser viável economicamente (Campinhos et al., 1984; Melo, 1999). Em linhas gerais um bom substrato é aquele que é firme e denso o suficiente para manter a estrutura de propagação, em condições até a germinação ou enraizamento e que não encolha ou expanda com a variação de umidade (Hoffmann, 1999). A finalidade mais importante de um substrato é produzir uma planta (ou muda) de alta qualidade, em menor tempo e a baixo custo (Abreu et al. 2002).

Rodrigues et al. (2003) demonstraram o desempenho superior do substrato Plantmax® e areia lavada na aclimatização de mudas micropropagadas de Helicônia. Zemke et al. (2003), avaliando substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira micropropagados, concluíram que o substrato comercial Plantmax® aumenta a biomassa vegetal, apesar de diminuir a colonização micorrízica. Segundo Pereira et al. (2003), avaliando substratos para aclimatização de abacaxi ornamental micropropagado, com o substrato Plantmax®, as mudas obtiveram uma taxa de sobrevivência de 96,67%.

A associação de materiais, especialmente em mistura com o solo, permite melhorar a textura e condições para um desenvolvimento das plantas. Assim, a grande maioria dos trabalhos com substrato inclui misturas de solo, a areia, vermiculita e materiais orgânicos. A mistura com materiais orgânicos beneficia as condições físicas do substrato e fornece nutrientes, favorecendo o desenvolvimento das raízes e da planta como um todo (Araújo, 2004).

A casca de arroz carbonizada vem sendo estudada em misturas de substratos para a produção de mudas e, segundo Minami (1995), possui forma floculada, coloração escura, é leve, de fácil manuseio, com grande capacidade de drenagem, pH levemente alcalino, baixa capacidade de retenção de água, rica em cálcio e potássio, livre de pragas e patógenos devido ao processo de carbonização.

Segundo Puchalski & Kämpf (2000), a casca de arroz carbonizada possui espaço de aeração, isto é, volume de macroporos, superior a 42% e porosidade total acima de 80%, que são características ideais para substratos utilizados em recipientes com pequeno volume.

A casca de arroz passa pelo processo de carbonização com o objetivo de diminuir a atividade biológica da mesma, eliminando resíduos que poderiam fermentar durante a utilização. Além disso, a carbonização aumenta a porosidade e elimina pragas e patógenos. A carbonização é um processo simples que pode ser realizado na propriedade sem a necessidade de construção de nenhuma estrutura específica (Vallone, 2003). Este mesmo autor, trabalhando com mudas de cafeeiro, concluiu que a substituição do substrato comercial por casca de arroz carbonizada, entre 60% e 70%, proporciona maior desenvolvimento das mudas e em menor tempo.

Uma função do substrato é nutrir a planta adequadamente. Porém, devido à sua composição, nem sempre o substrato contém nutrientes. É necessário, então, acrescentar o adubo para que o nível de nutrientes disponíveis esteja à altura do bom desenvolvimento das plantas (Minami, 2000). Melo (1999) avaliou o efeito de doses crescentes de fertilizante de liberação lenta em mudas de cafeeiro utilizando substrato comercial. Os resultados indicaram que a dose de 450 gramas do fertilizante de liberação lenta, formulação 15-10-10 + micronutrientes, em 55 litros do substrato (8,18kg de fertilizante m⁻³ de substrato) promoveu melhor desenvolvimento das mudas.

Experimento conduzido por Paiva et al. (1997) demonstrou, para as características altura das plantas, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea, da raiz e índice de doenças (*Cercospora*), que a presença do fertilizante de liberação lenta no substrato proporcionou melhores resultados do que a testemunha, além de uma antecipação de aproximadamente 20 dias na liberação das mudas de café para os produtores. O tratamento sem fertilizante de liberação lenta resultou em maior porcentagem de plantas doentes, a ponto das mudas não serem comercializadas.

Existem relativamente poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplantio e aclimatização, as dificuldades e as soluções encontradas durante este processo. Esta carência de informações é ainda maior no caso de grandes quantidades de plantas, em um sistema comercial de micropropagação. Embora existam algumas regras gerais (manutenção de alta umidade e temperatura amena), a experiência individual, a familiarização com a cultura, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores que determinam otimização desta fase (Grattapaglia & Machado, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG, no período de abril de 2004 a agosto de 2005.

3.1 ETAPA 1. Indução e desenvolvimento de embriões somáticos

Os explantes utilizados foram embriões somáticos diretos, provenientes de folhas de plântulas de *Coffea arabica* L. cv. Rubi oriundas de cultura *in vitro* de embrião zigótico. Os embriões somáticos foram induzidos em meio 'MS' (Tabela 1) com 50% dos sais, acrescido de 20,0mg L⁻¹ de GA₃, 6,0mg L⁻¹ de cinetina, 8,0mg.L⁻¹ de ANA, 100mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada e 400mg.L⁻¹ de extrato de malte. Os tubos foram mantidos durante 150 dias sob condições de obscuridade, com temperatura de 25 ± 1°C. Os embriões somáticos induzidos neste processo foram individualizados em tubos de ensaio e mantidos, durante 30 dias, em meio 'MS', objetivando a homogeneização do material para a realização dos experimentos 1 e 2.

Experimentos 1 e 2:

3.1.1 Experimento 1: NH₄NO₃ x KNO₃ - os tratamentos foram constituídos de cinco concentrações de NH₄NO₃ (0%, 25%, 50%, 75% e 100% da formulação de 1650mg.L⁻¹) e cinco concentrações de KNO₃ (0%, 25%, 50%; 75% e 100% da formulação de 1900mg.L⁻¹) adicionados ao meio MS.

3.1.2 Experimento 2: Sacarose x GA₃ - os tratamentos consistiram da combinação de quatro concentrações de GA₃ (0; 2,5; 5,0 e 10,0mg.L⁻¹) e cinco concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60g L⁻¹) adicionados ao meio 'MS'.

TABELA 1. Soluções nutritivas MS, White, WPM e Knudson, usados nos experimentos.

Compostos	Concentração final (mg.L ⁻¹)			
	MS	White	WPM	Knudson
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-	96	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	300	556	1000
KCl	-	65	-	-
KH ₂ PO ₄	170	-	170	250
KNO ₃	1900	-	-	-
K ₂ SO ₄	-	80	990	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	-	370	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	720	-	-
Na ₂ SO ₄	-	19	-	-
NH ₄ NO ₃	1650	200	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	400	-	500
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0025	-	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,001	0,25	0,062
Fe(SO ₄) ₃	-	2,5	-	-
H ₃ BO ₃	6,2	1,5	6,2	0,056
KI	0,83	0,75	-	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	7	22,3	7,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,25	0,25	0,026
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	3	8,6	0,331
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	-	27,8	25
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,2	-	37,2	-
Ác. nicotínico	0,5	0,5	0,5	-
Piridonina-HCl	0,5	0,1	0,5	-
Tiamina-HCl	0,5	0,1	1,0	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Glicina	2	3	2	-
Sacarose	30	30	20	20

No preparo do meio foram utilizadas soluções-estoque armazenadas em frascos de vidro escuro, a temperaturas em torno de 5°C. O meio foi solidificado com 5g.L⁻¹ de ágar e teve seu pH ajustado para 5,8 ± 0,1, utilizando NaOH 0,5 e 0,1N ou HCl 0,5N e 0,1N, e distribuído em tubos de ensaio, cada um recebendo 15mL do mesmo.

Os tubos foram vedados com tampas plásticas translúcidas antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1atm, por 20 minutos. Após o resfriamento, o meio foi levado à câmara de fluxo laminar desinfestada com álcool 70% (etanol), onde foi feita a inoculação dos embriões. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 32.µM.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25 ± 1°C.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5 (experimento 1) e 4 x 5 (experimento 2), com quatro repetições e três tubos por parcela, cada tubo contendo um explante.

Aos 150 dias após a instalação, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca das plântulas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para dados desbalanceados. Utilizou-se o procedimento GLM disponível no aplicativo computacional SAS[®] (SAS, 1990).

3.2 ETAPA 2. Desenvolvimento e aclimatização das plântulas

Para a realização dos experimentos 3 e 4, foram utilizados, como explantes, plântulas de *Coffea arabica* cv. Rubi, com 1 a 1,5cm de comprimento, provenientes da Etapa 1, mantidas durante 30 dias em meio 'MS', objetivando a homogeneidade do material.

Experimentos 3 e 4:

3.2.1 Experimento 3: Ágar x meios de cultura - os tratamentos consistiram da combinação de quatro diferentes tipos de meio (MS; Knudson; WPM; White) (Tabela 1) e cinco concentrações de ágar (0; 2; 4; 6 e 8g.L⁻¹).

3.2.2 Experimento 4: ANA x GA₃ – os tratamentos consistiram da combinação de quatro concentrações de GA₃ (0; 2,5; 5; 10mg.L⁻¹) e cinco concentrações de ANA (0; 0,25; 0,5; 1mg.L⁻¹) adicionados ao meio ‘MS’.

As condições de preparo do meio, transferência dos explantes e sala de crescimento foram as mesmas da etapa anterior. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e três tubos por parcela, cada tubo contendo um explante.

Aos 60 dias após a instalação, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca das plântulas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para dados desbalanceados. Utilizou-se o procedimento GLM disponível no aplicativo computacional SAS[®] (SAS, 1990).

Aclimatização de plântulas

Plântulas de *Coffea arabica* cv. Rubi, provenientes dos experimentos 3 e 4, foram transplantadas para bandejas de isopor com 72 células e mantidas sobre bancada de tela metálica em casa de vegetação equipada com sistema de nebulização intermitente. A bancada foi protegida na parte superior, acima da tubulação de nebulização, e nas laterais com tela de sombreamento 50% (sombrite[®]).

Experimento 5:

3.2.3 Experimento 5: Substrato x fertilizante de liberação lenta - os tratamentos constaram de dois tipos de substrato (Plantmax hortaliça® e Plantmax hortaliças ® mais casca de arroz carbonizada (50%)) e quatro doses do fertilizante de liberação lenta por 55 litros de substrato (0, 225, 450 e 900g, o que representa aproximadamente 0, 0,5, 1 e 2g do fertilizante por célula).

Para o enchimento dos recipientes foi utilizado o substrato comercial Plantmax® constituído de vermiculita e casca de pinus moída, compostada e enriquecida com nutrientes e também a casca de arroz carbonizada. Estes substratos foram complementados utilizando o fertilizante de liberação lenta, denominado Osmocote®, na formulação 15-10-10 + micronutrientes.

Após 60 dias, o experimento foi avaliado por meio do número de folhas e altura da planta. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 3 blocos e cinco plantas por parcela. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Tukey, utilizando o procedimento estatístico Sisvar® (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ETAPA 1 – Indução e desenvolvimento de embriões somáticos

4.1.1 Experimento 1. NH_4NO_3 x KNO_3

Houve efeito significativo das concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 para o número de folhas e peso da matéria fresca das plântulas (Tabela 2). Observa-se que a interação entre os fatores mostrou-se significativa em relação a todas as características avaliadas a 5% de probabilidade, pelo teste F.

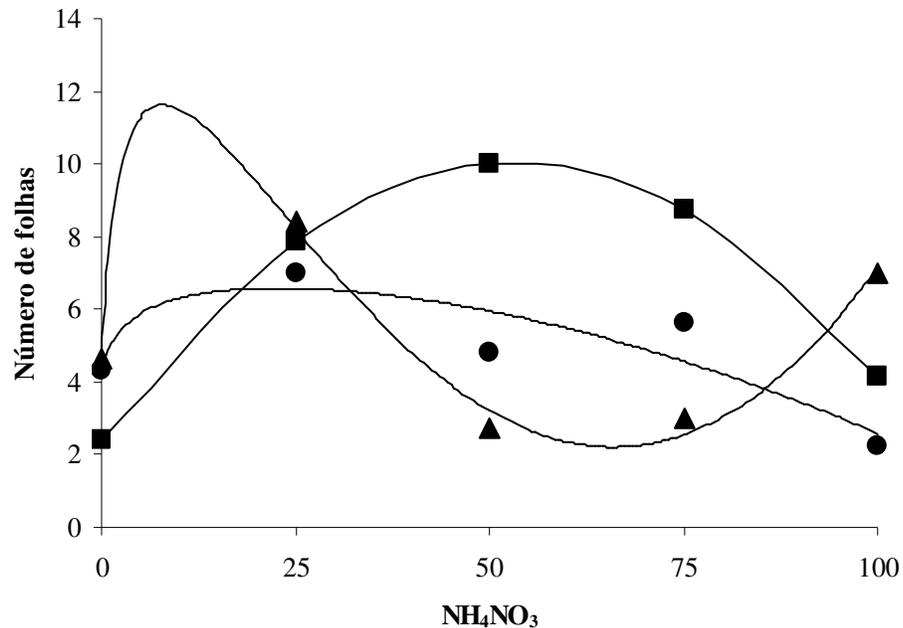
TABELA 2. Análise de variância dos dados relativos ao número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca (PMF) das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 . UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM		
		NF	CPA (cm)	PMF (g)
NH_4NO_3	4	45,8337*	0,1152	1,7450*
KNO_3	4	23,0014*	0,0837	2,2117*
NH_4NO_3 x KNO_3	16	20,4477*	0,1215*	1,5139*
Erro	135	9,1386	0,0584	0,5871
CV(%)		51,62	23,57	9,12

* Significativo a 5%, pelo teste F.

4.1.1.1 Número de folhas

Analisando-se as curvas de regressão, observa-se, na Figura 1, que houve formação de maior número de folhas quando foram adicionados ao meio de cultura 100% de KNO_3 combinado com 7,87 de NH_4NO_3 (média de 11,63 folhas). Com a utilização de 50% de KNO_3 combinada com 53,26% de NH_4NO_3 , pode-se observar a formação média de 10,01 folhas. Dessa forma, como a diferença é mínima, justifica-se a utilização de 50% de KNO_3 , com o objetivo de redução dos custos.



$Y_{KNO_3\ 25}, Y_{KNO_3\ 75} = ns$
 $\bullet Y_{KNO_3\ 0} = 4,35743 - 0,02046X - 0,0003936X^2 + 0,91484LN(X+1) R^2 = 0,7819$
 $\blacksquare Y_{KNO_3\ 50} = 2,38286 + 0,28657X - 0,00269X^2 R^2 = 0,9544$
 $\blacktriangle Y_{KNO_3\ 100} = 4,67671 - 0,70436X + 0,00471X^2 + 5,59020LN(X+1) R^2 = 0,9811$

FIGURA 1. Número folhas de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de NH₄NO₃ combinadas com 0%, 50% e 100% de KNO₃. UFLA, Lavras, MG, 2005.

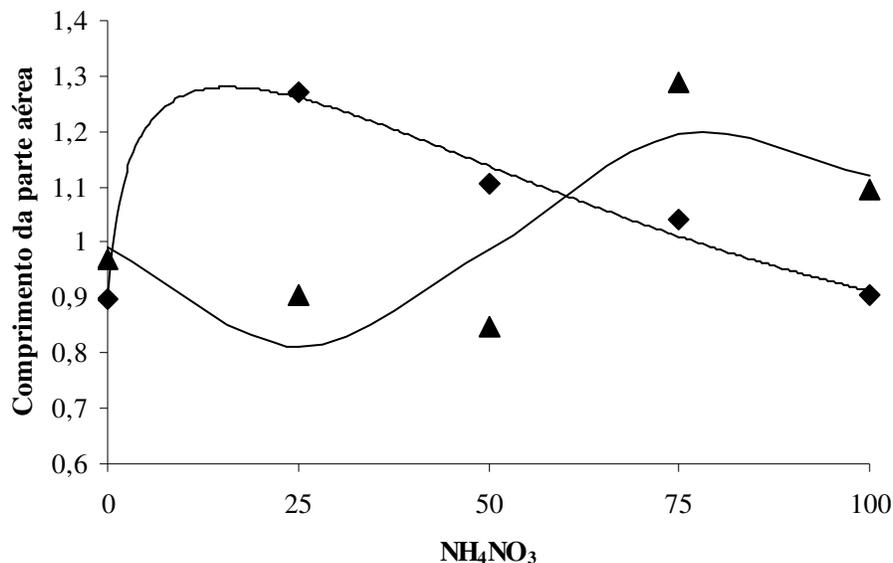
Contudo, concentrações acima de 53,26% de NH₄NO₃ provocaram redução no número de folhas, possivelmente por toxidez causada pelo amônio, devido à sua concentração mais elevada em relação ao nitrato no meio de cultura. Quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez (Yatazawa & Furuhashi, 1968; Gamborg e Shyluk, 1970), demonstrando assim a necessidade de combinação dessas duas fontes no meio de cultura.

O número de folhas obtidas na ausência de KNO_3 foi inferior, quando comparado aos demais tratamentos (a maior média observada foi 6,58 folhas na concentração de 22,81% de NH_4NO_3), evidenciando, assim, a importância desse sal para o desenvolvimento de folhas em plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi. Os resultados obtidos confirmam citações (Sakuta & Komamine, 1987; Magalhães & Wilcox, 1987), de que o nitrogênio é um dos elementos essenciais e ativos para diversos processos metabólicos da planta, pois, é constituinte de várias biomoléculas essenciais, tais como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros.

4.1.1.2 Comprimento da parte aérea

Por não apresentar normalidade dos resíduos, os dados relativos ao comprimento da parte aérea foram transformados para \sqrt{x} . Analisando-se o efeito das concentrações de KNO_3 e NH_4NO_3 no gráfico da Figura 2, observa-se que a utilização de 50% de KNO_3 , associada a 15,81% de NH_4NO_3 , promoveu o maior desenvolvimento da parte aérea (1,28cm, dados transformados). Os resultados concordam, em parte, com aqueles obtidos por Ribeiro (2001), trabalhando com embriões de zigóticos de *C. arabica* L., que recomendam a adição de 50% de NH_4NO_3 e KNO_3 no meio de cultura para comprimento da parte aérea.

Observa-se, ainda, que, utilizando-se a concentração de 75% de KNO_3 há redução no comprimento da parte aérea das plântulas até a concentração de 25,51% de NH_4NO_3 , havendo, a partir desse ponto, incremento no desenvolvimento da variável até a concentração de 78,49% de KNO_3 (1,32cm). Na ausência de nitrogênio, em ambas as concentrações estudadas, o comprimento da parte aérea foi inferior, evidenciando, mais uma vez, a importância desse nutriente no desenvolvimento de embriões em *C. arabica* L. cv. Rubi.



$Y_{KNO_3\ 0}, Y_{KNO_3\ 25}, Y_{KNO_3\ 100} = ns$

◆ $Y_{KNO_3\ 50} = 0,90002 - 0,01368X + 0,00004223X^2 + 0,20762LN(X+1) R^2 = 0,9793$

▲ $Y_{KNO_3\ 75} = 0,99217 - 0,01854X + 0,00054029X^2 - 0,00000342X^3 R^2 = 0,6948$

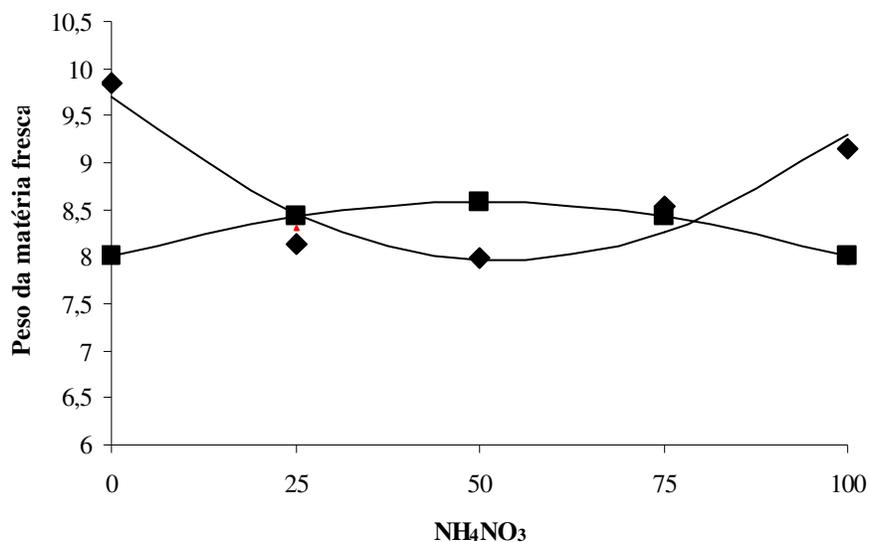
FIGURA 2. Comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de NH₄NO₃ combinadas com 50% e 75% de KNO₃. UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.1.1.3 Peso da matéria fresca

A análise de variância do peso da matéria fresca foi realizada utilizando o procedimento GLM do software estatístico SAS[®] (SAS, 1990), por meio do método dos quadrados mínimos ponderados pelo inverso das variâncias de cada tratamento, uma vez que estes apresentaram heterogeneidade de variâncias. Por não apresentarem normalidade dos resíduos, os dados foram transformados para $(\sqrt[5]{x} + 1)/0,2$.

Na ausência de KNO₃ houve decréscimo do peso da matéria fresca, associado ao incremento das concentrações de NH₄NO₃ até a concentração de

55,62% de NH_4NO_3 (Figura 3), observando-se aumento do peso da matéria fresca a partir daí. Resultados semelhantes podem ser observados utilizando-se a concentração de 100% de concentração de KNO_3 , no qual os dados apresentam decréscimo até a concentração de 63,3% de NH_4NO_3 . Para a concentração de 50% de KNO_3 ocorreu aumento do peso da matéria fresca até a concentração de 60,74% de NH_4NO_3 . Porém, o maior valor foi registrado na ausência de ambos os sais estudados (9,76g). Esses resultados confirmam a citação de Sakuta e Komamine (1987) de que, de maneira geral, alta concentração de sais do meio MS, especificamente de amônio e nitrato, pode ser crítica ao processo de morfogênese e crescimento.



$$Y_{\text{NH}_4\text{NO}_3 \ 25}; Y_{\text{NH}_4\text{NO}_3 \ 75}; Y_{\text{NH}_4\text{NO}_3 \ 100} = \text{ns}$$

$$\blacklozenge Y_{\text{NH}_4\text{NO}_3 \ 0} = 9,68811 - 0,06491X + 0,00061019X^2 \quad R^2 = 0,9017$$

$$\blacksquare Y_{\text{NH}_4\text{NO}_3 \ 50} = 8,00708 + 0,02278X - 0,00022883X^2 \quad R^2 = 0,9053$$

FIGURA 3. Peso da matéria fresca de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de NH_4NO_3 combinadas com 0% e 50% de KNO_3 . UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.1.2 Experimento 2. Sacarose x GA₃

Houve efeito significativo das concentrações de GA₃ para comprimento da parte aérea (Tabela 3). A concentração de sacarose mostrou-se significativa em relação ao número de folhas. Não foram verificadas diferenças significativas na interação entre os fatores, pelo teste F.

TABELA 3. Análise de variância dos dados relativos ao número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca (PMF) das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de sacarose e GA₃. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM		
		NF	CPA (cm)	PMF (g)
GA ₃	3	1,3452	0,9169*	0,3521
Sacarose	4	14,5183*	0,3993	0,4887
Sacarose x GA ₃	12	1,8336	0,3910	0,4064
Erro	42	1,0000	0,2723	0,3233
CV(%)		53,73	46,24	21,47

Significativo a 5%, pelo teste F.

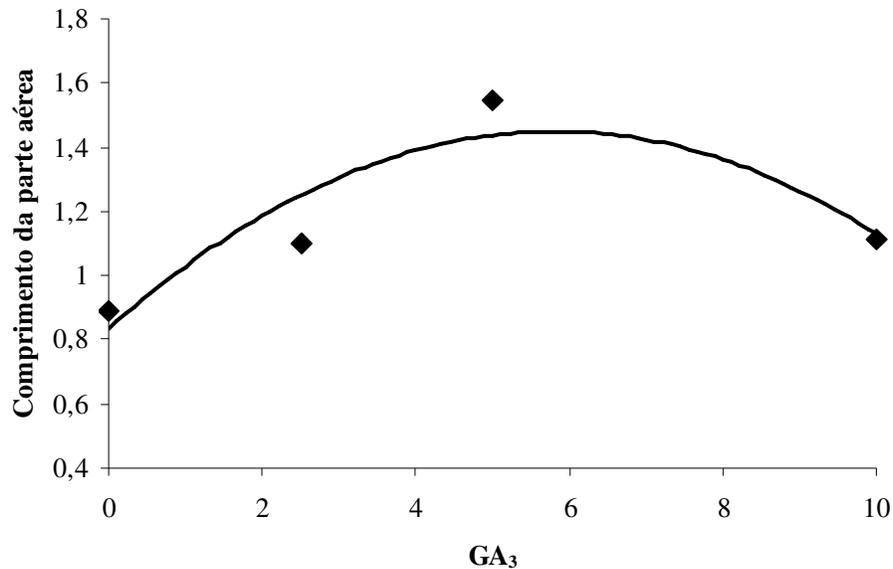
4.1.2.1 Número de folhas

A análise de variância foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do software estatístico SAS[®] (SAS, 1990), por meio do método dos quadrados mínimos ponderados pelo inverso das variâncias de cada tratamento, uma vez que esses apresentaram heterogeneidade de variâncias. Com o desbalanceamento ocorrido devido à perda de parcelas, houve necessidade de se utilizar o método LSMEANS do software estatístico SAS[®] (SAS, 1990) para a obtenção de médias ajustadas. No caso especial de número de folhas, o desbalanceamento foi de maior intensidade ocasionando, devido a este, problemas de estimabilidade de algumas médias e impossibilitando a comparação deste fator.

4.1.2.2 Comprimento da parte aérea

Melhor resultado para comprimento da parte aérea (Figura 4) foi obtido com a utilização de $5,81\text{mg.L}^{-1}$ de GA_3 (1,45cm). Este fitorregulador participa de muitas atividades fisiológicas importantes, tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento caulinar (Crocomo & Cabral, 1988). Esses resultados concordam com Rezende et al. (2001) que, trabalhando com embriões imaturos de *C. canephora*, obteve os melhores resultados com 5mg.L^{-1} de GA_3 . Esse efeito positivo do GA_3 também foi observado por outros autores com *C. arabica*, a exemplo de Pereira (2005), na cultivar Acaiá Cerrado e por Cavalcante-Alves et al. (1999), na cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44 e com outras espécies, a exemplo de Chagas (2003) que, trabalhando com embriões imaturos de *Citrus* obteve maior comprimento da parte aérea com 10mg.L^{-1} de GA_3 .

Porém, concentrações acima de $5,81\text{mg.L}^{-1}$ promoveram inibição no desenvolvimento da plântula, provavelmente causada por efeito fitotóxico do regulador, concordando com a afirmação de Válio (1976) de que, na cultura de café, baixas concentrações de ácido giberélico promovem a germinação de embriões. Este mesmo autor verificou que altas concentrações de ácido giberélico podem causar a morte do embrião.



$$\blacklozenge y = -0,0182x^2 + 0,2117x + 0,8347 \quad R^2 = 0,8371$$

FIGURA 4. Comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de GA₃. UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.2 ETAPA 2. Desenvolvimento e aclimatização de plântulas

4.2.1 Experimento 3. Ágar x meios de cultura

Houve efeito significativo dos meios de cultura estudados para o número de folhas, comprimento da parte aérea e o peso da matéria fresca das plântulas (Tabela 4). A concentração de ágar também mostrou-se significativa em relação a estas duas últimas características. A interação entre os fatores influenciou significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste F, o número de folhas e o peso da matéria fresca das plântulas.

TABELA 4. Análise de variância dos dados relativos ao número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca (PMF) das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de ágar e diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM		
		NF	CPA (cm)	PMF (g)
Meio	3	44,4934*	0,2386*	4,3466**
Ágar	4	20,1864	0,3008*	4,7701**
Meio x Ágar	12	25,3185*	0,6179	0,5356*
Erro	180	9,2219	0,0351	0,2692
CV(%)		82,52	15,68	6,20

*,** Significativos a 1% e 5%, respectivamente, pelo teste F.

4.2.1.1 Número de folhas

O meio WPM, na ausência de ágar, apresentou os melhores resultados para número de folhas (Figura 5), com média de 8,39 folhas. Houve um decréscimo até a concentração de 2,67g.L⁻¹ de ágar (média de 3,54 folhas), apresentando um ligeiro aumento até a concentração de 5,90g.L⁻¹ de ágar (com média de 4,02 folhas). Esses resultados confirmam a citação de Caldas et al. (1998) de que os meios líquidos favorecem a absorção de nutrientes e minerais e a citação de Pierik (1987) de que qualquer exsudato proveniente do explante é mais facilmente diluído em meios líquidos do que em meio com ágar, evitando, dessa maneira, o acúmulo de tais compostos tóxicos. Possuem também a vantagem de preparo mais rápido e mais barato do que os meios sólidos.

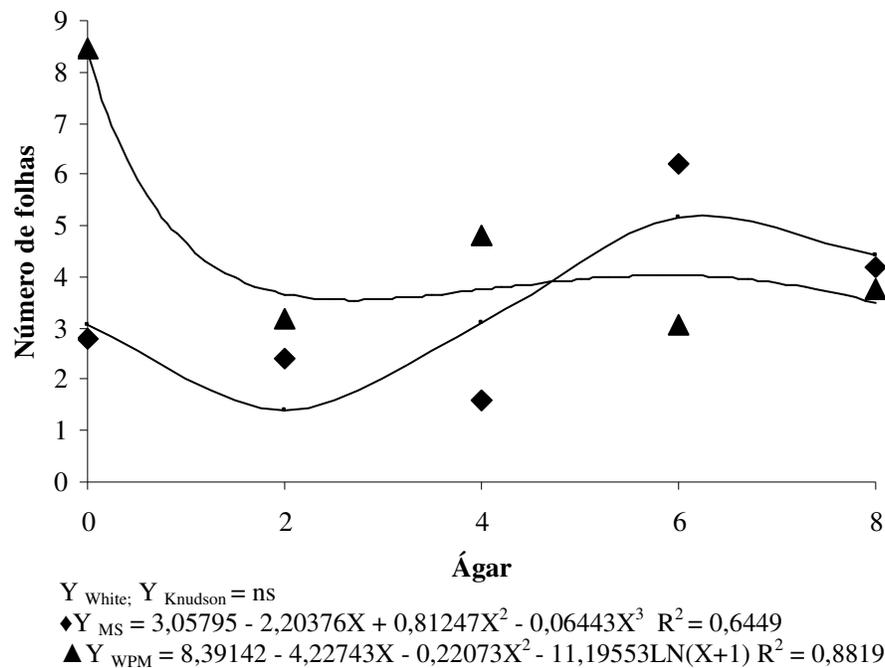
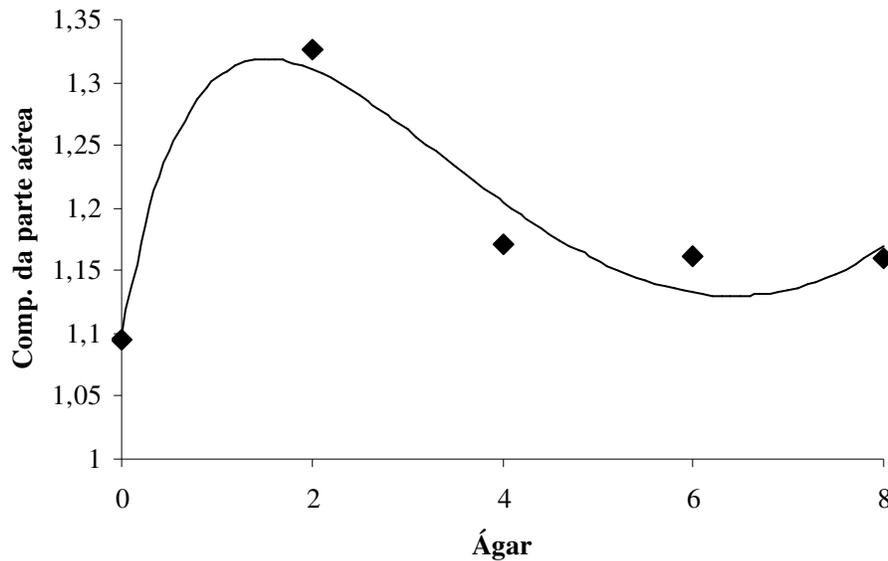


FIGURA 5. Número de folhas de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de ágar acrescidas nos meios de cultura MS e WPM. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Utilizando-se o meio MS, observou-se o decréscimo até a concentração de 1,69g.L⁻¹ de ágar (média de 1,34 folhas), havendo, a partir desta dose, um incremento no número de folhas até a concentração de 6,71g.L⁻¹ de ágar (média de 5,38 folhas). Esses resultados seguem a mesma tendência daqueles obtidos por Pasqual et al. (2002) e Ribeiro (1999), trabalhando, respectivamente com embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’ e laranja ‘Natal’ em meio MS, que também obtiveram o maior número de folhas utilizando alta concentração de ágar (8,5g.L⁻¹ de ágar com pH ajustado para 4,7).

4.2.1.2 Comprimento da parte aérea

Por não apresentar normalidade dos resíduos, os dados relativos ao comprimento da parte aérea foram transformados para \sqrt{x} . O maior comprimento da parte aérea foi observado na concentração de 1,52g.L⁻¹ de ágar (Figura 6), apresentando média de 1,31cm, havendo, a partir deste ponto, redução do comprimento com o incremento de concentrações de ágar. Esses resultados, concordam com Pasqual et al. (2002), que obtiveram maior altura de plântulas de tangerina ‘Poncã’ oriunda de embriões imaturos, com a utilização de MS com pH ajustado para 4,7 na ausência ou baixa concentração de ágar e Pio et al. (2001) que, trabalhando com bananeira cv. Prata Anã, observaram maior altura da planta com 1,75g.L⁻¹ de ágar adicionado ao meio.



$$\blacklozenge Y = 1.0976 - 0.40617X + 0.02268X^2 + 0.85071\text{LN}(X+1); R^2 = 92.04\%$$

FIGURA 6. Comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de ágar. UFLA, Lavras, MG, 2005.

O gráfico da Figura 7 representa o comprimento da parte aérea das plântulas nos meios de cultura estudados. O meios MS e WPM apresentaram efeito superior ao meio White. O meio Knudson igualou-se estatisticamente aos demais. Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Jesus et al. (2003), trabalhando, no qual o meio WPM se igualou ao meio MS no comprimento da parte aérea de segmentos nodais de *C. arabica* L. cv. Catuaí e concordam parcialmente com Ribeiro (2001) que, trabalhando com embriões zigóticos da cultivar Rubi, obteve os melhores resultados utilizando o meio MS e os piores resultados quando utilizou o meio Knudson e WPM, ficando o meio White numa posição intermediária. Essa mesma resposta foi encontrada em estudos com *Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira Branca) realizados por Coelho (1999), em que os segmentos nodais foram melhor estabelecidos em meio WPM, quando comparado com o meio MS e outros. Em *Tournefortia cf paniculata* (Marmelinho), Bertolucci (1999), quando comparou o meio WPM com o meio básico completo de MS, em relação ao tamanho das brotações, notou um incremento de 30% quando se utilizou o WPM. Esta diferença entre o comportamento dos embriões no meio de cultura está relacionada aos elementos nutricionais nele existentes.

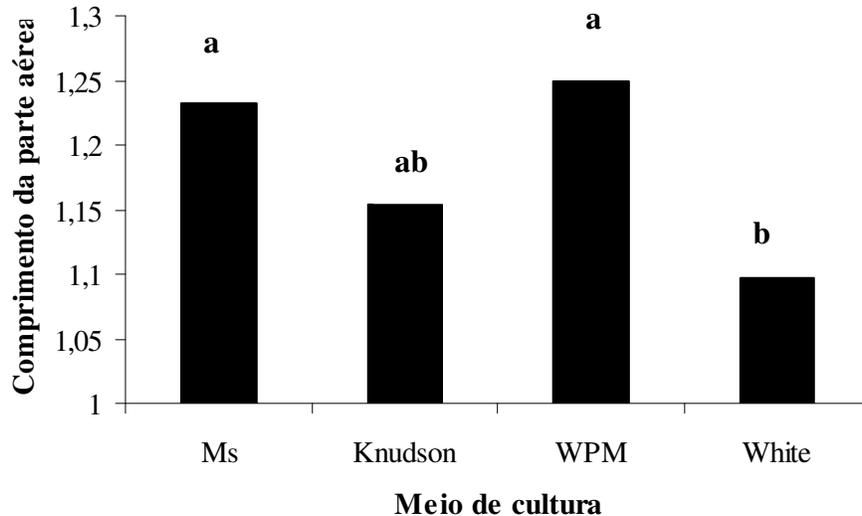
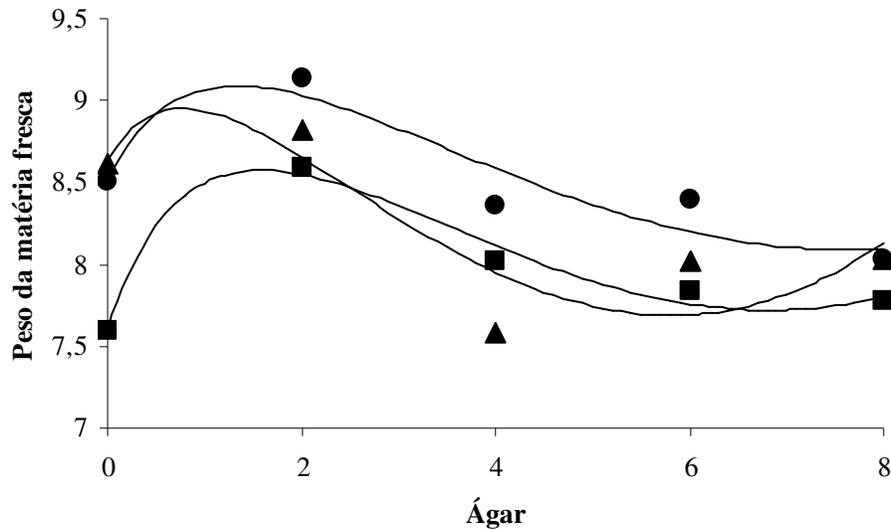


FIGURA 7. Comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi, cultivados em diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.2.1.3 Peso da matéria fresca das plântulas

Por não apresentar normalidade dos resíduos, os dados relativos ao peso da matéria fresca foram transformados para $(\sqrt[5]{x} + 1)/0,2$. No gráfico da Figura 8 observa-se que o meio WPM combinado à concentração $1,33\text{g.L}^{-1}$ de ágar apresentou os melhores resultados para peso da matéria fresca (9,09g, dados transformados). Quando utilizadas as concentrações de $0,77\text{g.L}^{-1}$ de ágar no meio Knudson e de $1,58\text{g.L}^{-1}$ de ágar no meio White observa-se peso da matéria fresca de 8,09 e 8,57g, respectivamente (dados transformados). Observa-se ainda, que, concentrações maiores que $1,58\text{g.L}^{-1}$ de ágar foram prejudiciais ao aumento do peso da matéria fresca em todos os meios de cultura estudados, concordando com os resultados adquiridos por Salermo & Zaffari (1999) que trabalharam com 1g.L^{-1} de ágar adicionado ao meio nutritivo na micropropagação de bananeira ‘Grande Naine’.



▲ $Y_{\text{Knudson}} = 8,63378 - 1,77874X + 0,11725X^2 + 2,83145\text{LN}(X+1) R^2 = 0,7128$
 ● $Y_{\text{WPM}} = 8,51490 - 1,22632X + 0,06163X^2 + 2,47816\text{LN}(X+1) R^2 = 0,8434$
 ■ $Y_{\text{White}} = 7,59694 - 1,65801X + 0,08815X^2 + 3,56387\text{LN}(X+1) R^2 = 0,9732$

FIGURA 8. Efeito de concentrações de ágar em diferentes meios de cultura no peso da matéria fresca de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Os melhores resultados alcançados em meios mais líquidos ocorrem devido à maior facilidade de absorção de nutrientes e reguladores de crescimento e também ao maior contato basal (Romberger & Tabor, 1971). Além disso, qualquer exsudato proveniente do explante é mais facilmente diluído do que em meio com ágar, evitando, dessa maneira, o acúmulo de tais compostos tóxicos (Pierik, 1987). Pasqual et al. (2002), por exemplo, obtiveram maior massa fresca em embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’ na ausência de ágar.

4.2.2 Experimento 4. ANA x GA₃

Houve efeito significativo da concentração de GA₃ para o comprimento da parte aérea (Tabela 5). A concentração de ANA mostrou-se significativa em relação ao peso da matéria fresca das plântulas. Não houve efeito significativo para interação em nenhuma das características avaliadas, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

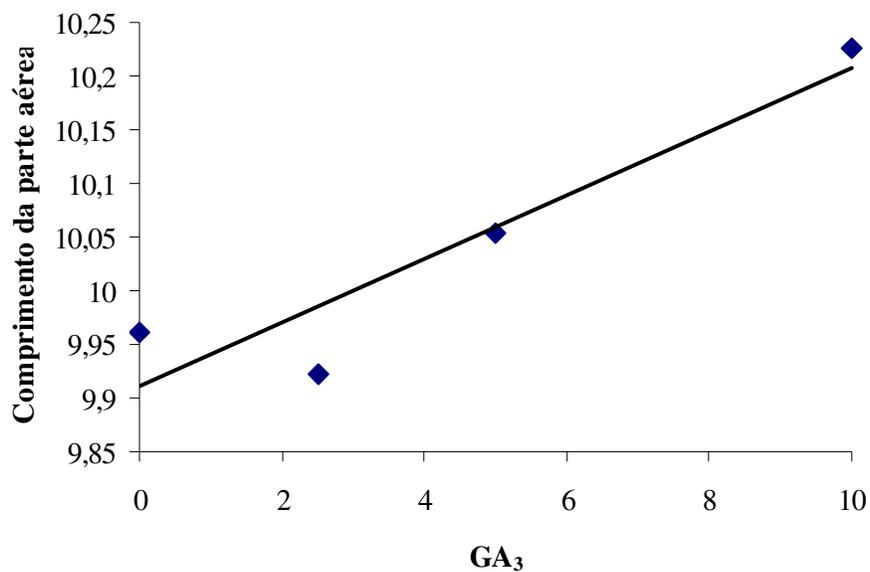
TABELA 5. Análise de variância dos dados relativos ao número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria fresca (PMF) das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de GA₃ e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM		
		NF	CPA (cm)	PMF (g)
GA ₃	3	18,3057	0,5651*	0,0088
ANA	4	19,9366	0,1691	0,0537*
GA ₃ x ANA	12	1,9343	0,1282	0,0083
Erro	113	11,4942	0,1452	0,0131
CV(%)		45,13	3,79	63,81

* Significativo a 5%, pelo teste F.

4.2.2.1 Comprimento da parte aérea

Por não apresentar normalidade dos resíduos, os dados relativos ao comprimento da parte aérea foram transformados para $(\sqrt[5]{x} + 1)/0,2$. Observou-se que houve resposta crescente do comprimento da parte aérea à medida que se aumentou a concentração de GA₃, obtendo-se plântulas com 10,21cm na concentração de 10mg.L⁻¹ (Figura 9). Outros autores obtiveram bons resultados utilizando concentrações mais altas do regulador, como por exemplo, Pereira (2005), com utilização de 14,2mg.L⁻¹ de GA₃ associados a 0,5mg.L⁻¹ de ANA e Cavalcante-Alves et al. (1999) que, em presença de 9mg.L⁻¹ de BAP adicionado de 20,0mg.L⁻¹ de GA₃, obtiveram maior número de brotos maiores que 1cm .



$$y = 0,0297x + 9,911 \quad R^2 = 0,8782$$

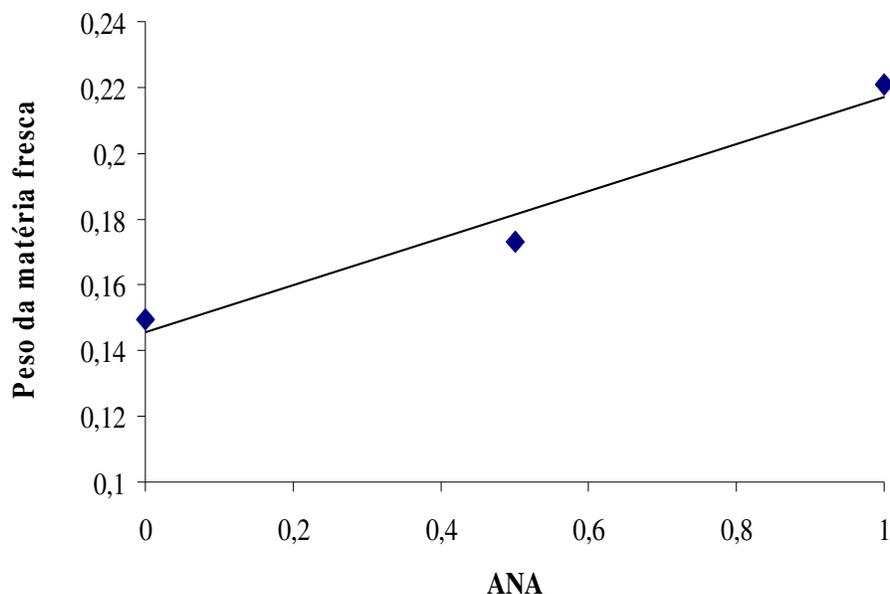
FIGURA 9. Efeito de diferentes concentrações de GA₃ no comprimento da parte aérea plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.2.2.2 Peso da matéria fresca

Para peso da matéria fresca, houve resposta crescente até a concentração máxima de ANA no meio, obtendo-se 0,22 g na concentração de 1mg.L⁻¹ (Figura 10).

Outros autores obtiveram bons resultados utilizando concentrações inferiores de ANA, podendo-se citar Pereira (2005), que registrou o melhor resultado para massa fresca da parte aérea de plântulas de cafeeiro cv. Acaiaí Cerrado, com 0,75mg.L⁻¹ de ANA e Andrade et al. (2001) que, estudando embriões zigóticos de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, obteve melhores

resultados para massa fresca com adição de $0,53\text{mg.L}^{-1}$ de ANA ao meio de cultura.



$$y = 0,0714x + 0,1455 \quad R^2 = 0,9617$$

FIGURA 10. Efeito de diferentes concentrações de ANA no peso da matéria fresca de plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi. UFLA, Lavras, MG, 2005.

4.2.3 Experimento 5. Substrato x fertilizante de liberação lenta

Não houve efeito significativo das concentrações de substrato e fertilizante e da interação entre os fatores em nenhuma das características avaliadas, a 5% de probabilidade, indicando que, para as condições estudadas, os substratos não possuem comportamento diferente quando na presença de diferentes fertilizações (Tabela 6). Houve 100% de pegamento das mudas, indicando a eficiência do processo de aclimatização.

TABELA 6. Análise de variância dos dados relativos ao número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas de *C. arabica* L. cv. Rubi cultivadas em diferentes concentrações de fertilizante de liberação lenta e diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fonte de Variação	GL	QM	
		NF	CPA (cm)
Substrato (S)	1	1,2150	0,4620
Fertilizante (F)	3	1,4168	0,2144
S x F	3	0,2275	0,1268
Bloco	2	63,8304	3,7584
Erro	14	2,7125	0,3120
CV(%)		17,48	37,71

5 CONCLUSÕES

É possível a obtenção de plântulas micropropagadas de *Coffea arabica* L. cultivar Rubi via embriogênese somática direta.

O uso de 50% de NH_4NO_3 e KNO_3 é eficiente no desenvolvimento de embriões somáticos. A utilização de $5,81\text{mg.L}^{-1}$ de GA_3 proporciona bom desenvolvimento no comprimento da parte aérea.

O meio WPM acrescido de 10mg.L^{-1} de GA_3 e 1mg.L^{-1} de ANA apresenta eficiência para o desenvolvimento de plântulas de cafeeiro. Nestas, a concentração de $1,5\text{mg.L}^{-1}$ de ágar proporciona maior número de folhas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.F. de; ABREU, C.A. de; BATAGLIA, O.C. Uso da análise química na avaliação da qualidade de substratos e componentes. In: FURLANI, A.M.C. et al. **Caracterização, manejo e qualidade de substratos para a produção de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002. p.17-28. (Documentos IAC, 70).

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIRE, N.A. Histology of somatic embryogenesis from floral tissue of cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.46, p.187-194, 1996.

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

ANDRADE, L.M. da C. et al. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1063-1070, set./out. 2001.

ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28.

ANUARIO BRASILEIRO DO CAFÉ. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2005. 136p.

ARAÚJO, A.G. **Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de Orquídea**. 2004. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARDITT, J. Niacin biosynthesis in germinating x *Laeliocattlya* orchid embryos and young seedlings. **American Journal of Botany**, Columbus, v.54, n.3, p.291-298, Mar. 1967.

BANDEL, G. et al. Aspectos citológicos da diferenciação de tecidos de cafeeiros *in vitro*. **Anais da “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”**, v.32, p.717-724, 1975.

BERTHOULY, M. Biotecnologías aplicadas al mejoramiento genético del cafeeiro. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECNOLOGY IN THE

COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina. **Proceedings...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p.9-22.

BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Somatic Embryogenesis of coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA DA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...**Londrina: IAPAR/UFPR/IRD, 1999. p.23-26.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, n.2, p.169-176, 1996.

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica in vivo e in vitro de *Tournefortia cf paniculata* Cham.** 1999. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobiquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BIEYSSE, C.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal Botany**, v.71, p.1496-1502, 1993.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1998. 547p.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1999. v.2. p.679-736.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v.2. p.87-132.

CAMPINHOS Jr., E.; IKEMORI, Y.K.; MARTINS, F.C.G. Determinação do meio de crescimento mais adequado à formação de mudas de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp. em recipientes plásticos rígidos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, 1984, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1984. p.350-365.

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, Z., 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1974. p.299-300.

CATUNDA, P.H.A. **Aclimatização de plântulas micropropagadas**. 2004. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAVALCANTE-ALVES, J.M. et al. Micropropagação de *Coffea arabica* L.: influência de BAP e GA₃. **Unimar Ciências**, v.8, n.4, p.95-100, 1999.

CHAGAS, E.A. **Cultivo de embriões imaturos provenientes da hibridação controlada entre ‘Pera Rio’ e ‘Poncã’**. 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CLAPHAN, D. Haploid Hoodlum plants from anthers *in vitro*. **Zeitung Pflanzenzüchtung**, Hamburg, v.69, n.2, p.142-155, 1973.

COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira [*Ptirodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CORDEIRO, A.T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 110p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

CROCOMO, O.J.; CABRAL, J.B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília: Associação Brasileira de Educação Superior, 1988. 39p. (Curso de Agricultura Tropical. Módulo I: O Ambiente e as Plantas Tropicais).

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.

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.

DENNG, R.; DONNELLY, D.J. In vitro hardening of red raspberry transferred through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Canadian Journal Plant. Science**, v.73, p.1105-1113, 1993.

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

DUBLIN, P. Embryogenesis somatique directe sur fragments de feuilles de cafier Arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.25, n.4, p.237-241, 1981.

DUBLIN, P. Tequiniques de reproduction vegétative "in vitro" et amelioration genétique chez les cafélers cultives. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.28, n.4, p.231-244, 1984.

DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos e aplicaciones**. Turrialba, Costa Rica, 1991. p.612-642.

ETIENNE, H.; BERGER, A.; CARRON, M.P. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. **Physiology Plant.**, v.82, p.213-218, 1991.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REGIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FIGUEIRA, E.R. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura**. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **New phytol.**, v.86, p.213-218, 1980.

GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiology**, v.45, p.598-600, 1970.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1 The technology. 2.ed. Edington: Exegetis, 1993. 574p.

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

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories.** British Library, Great Britain, 1984. 709p.

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

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. p.533-568.

GUIMARAES, R.J.; MENDES, A.N.G.; SOUZA, C.A.S. **Cafeicultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. v.1, 317p.

HATANAKA, T. et al. Effect of plant hormones on somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto. **Annales...** Paris: ASIC, 1995. p.790-797.

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

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta enxertos de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M 26’.** 1999. 240 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JESUS, A.M.S. et al. Efeito de diferentes concentrações de BAP e dos meios básicos MS e WPM na proliferação e desenvolvimento de brotos axilares de *Coffea arabica in vitro*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL. 3., 2003, Porto Seguro. **Resumos.** Brasília: Embrapa Café, 2003. p.93.

KOCHBA, J. et al. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, London, v.38, p.795-802, 1974.

KONAR, R.N.; NAKARAJA, K. Morphogenesis of isolated floral buds of *Ranunculus sceleratus* L. *in vitro*. **Acta Botanica Neerlandica**, v.18, p.680-699, 1969.

KRUG, C.A. Melhoramento do cafeeiro. **Boletim** v.20, p.833-872, 1945.

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, 1981.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalennia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators. Society Combined Proceedings, Seattle**. v.30, p.421-427, 1980.

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

MAGALHÃES, J.R.; WILCOX, G.E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.6, p.576-585, 1987.

MATIELLO, J.B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo Rural, 1991. 320p. (Coleção do Agricultor: Grãos).

MATIELLO, J.B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro / Viçosa: Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento / SARC/PROCAFÉ- SPC/DECAF. Fundação Procafé, 2002. 387p.

MATSUDA, K.; KIKIUTA, Y.; OKAZAWA, Y. A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. **Journal of Agriculture**, v.60, n.9, p.183-193, 1981.

MAYNE, W.W. The growth and bearing habits of *Coffea arabica* L. under south Indian conditions. **Plant. Chron**, v.39, p.284-286, 1944.

MELO, B. de. **Estudos sobre produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes**. 1999. 119p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG.

MENDES, C.H.T. Introdução ao estudo de auto-esterilidade no gênero *Coffea*. **Bragantia**, v.9, p.35-41, 1949.

MENDES, A.N.G. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: MENDES, A.N.G.; GUIMARÃES, R.J. (Ed.). **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. v.1, p.1-98.

MENDES, A.N.G. Métodos de melhoramento empregados na cultura do cafeeiro. In: SIMPOSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. p.18-35.

MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.155-203.

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura.** São Paulo: Fundação Salim Farah Maluf, 1995. 128p.

MINAMI, K. Adubação em substrato. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. **Substratos para plantas:** a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Gênese, 2000. p.147-152.

MORAES FERNANDES, M.I.B. de. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.311-332.

MOREIRA, M.A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola.**, 2001. 81p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, n.15, p.473-497, 1962.

NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Japanese Journal of Crop Science**, v.61, n.3, p.476-486, 1992.

NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M.; JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. **Hortscience**, v.20, p.214-215, 1985.

NICKELL, L.G. Plant growth substances. **Encyclopedia of Chemical Technology**, v.18, p.1-23, 1982.

NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. Montpellier, **ASIC 15° Colloque**, p.73-7, 1993.

OWUOR, J.B.O. *In vitro* initiation of arabusta coffee hybrids. **Kenya Coffee**, v.52, n.1, p.59-62, 1987.

PAIVA, L.C. et al. Efeitos de fontes de fertilizante de liberação controlada (Osmocote) na produção de mudas de cafeeiro (*C. arabica* L.) em tubetes. In: SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/CNPQ., 5.; CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA - CICESAL, 10., 1997. **Anais...** Lavras. UFLA, 1997. 79p.

PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 2000. 80p.

PASQUAL, M. et al. **Meios de Cultura:** Componentes e propriedades dos meios de cultura. Lavras: UFLA / FAEPE, 1998. 127p.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'poncã' em função do PH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira Agrocência**, v.8, n.3, p.199-202, set./dez. 2002.

PASQUAL, M.; PINTO J.E.B. Cultura de embriões. **Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, v.9, p.2-12, 1988.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do agar. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.242, p.431-443, jul./ago. 1995.

PEREIRA, A.B. et al. Avaliação de substratos na aclimação de mudas *in vitro* de abacaxi ornamental (*Anana lucidus* Miller.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS. 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p.258.

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

PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff, 1987. 344p.

PIERSON, E.S. et al. In vitro development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v.115, n.2/3, p.208-216, 1983.

PIO, R. et al. Propagação *in vitro* de bananeira (*Musa* sp.) utilizando-se diferentes concentrações de ágar. **Unimar Ciências**, v.10, n.1, 2001. p.69-73.

PUSHALSKI, L.E.A.; KÄMPF, A.N. Efeito da altura do recipiente sobre a produção de mudas de *Hibiscus rosa sinensis* L. Em plugs. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). **Substrato para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese, 2000. p.209-215.

RAJYALAKSHMI, K. et al. High frequency regeneration of plantlets from the leaf-bases via somatic embryogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiology Plant**, v.82, p.617-623, 1991.

RAMALHO, M.A.P. Genética: seleção recorrente no melhoramento do cafeeiro. 1999. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/-ocafezal>>. Acesso em: 17 set. 2005.

REZENDE, J.C. de. et al. Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado e GA₃ na cultura *in vitro* de embriões imaturos de cafeeiro (*Coffea canephora* Pierre). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Resumos**. Ilhéus, 2001. p.290.

RHAGAVAN, V.; TORREY, J.G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. **Plant Physiology**, Maryland, v.39, n.4, p.691-699, 1964.

RIBEIRO, A.O. **Definição do meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba**. 1999. 39p. Monografia (Especialização em Biotecnologia)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

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

RIBEIRO, M.T.F. et al. 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: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Desafios e potencialidades da agricultura no sul de Minas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. p.1-17.

RODRIGUES, P.H.V. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia (Heliconiaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003. Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p.289.

ROMBERGER, A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, v.58, p.131-140, 1971.

SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Cell grow and accumulation of secondary. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plantas: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic, 1987. Cap.5, v.4, p.97-114.

SALERMO, A.R.; ZAFFARI, G.R. Micropropagação de Bananeira (*Musa* sp. Grupo AAA, Subgrupo Cavendish): efeito do espaçamento e empilhamento de de recipientes em sala de crescimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.204-207, 1999.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: Procedures guide: version 6**. Cary, NC: 1990, 705p.

SCHOPKE, C.; MULLER, L.E.; KOHLENBACH, H.W. Coffee protoplasts: isolation, culture and plantlet regeneration. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 12., 1987, Montreaux. **Annales...** Paris: ASIC, 1987. p.426-432.

SHARP, W.R. et al. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, Buenos Aires, v.31, p.67-74, 1973.

SHARP, W.R. et al. The physiology on *in vitro* assexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.

SINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.227-228, Apr. 1984.

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.

SÖNDAHL, M.R. Interações de citocininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 6., 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1978. p.67.

SÖNDAHL, M.R. et al. Coffee. In: AMMYRATO M., (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York, 1984. p.564-590.

SÖNDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R. et al. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p.215-232.

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

SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultura leaf explant of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, v.81, n.4, p.395-408, 1977.

SPIRAL, J.; PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Annales...** Paris: ACIC, 1991. p.383-390.

SREENATH, H.L. Biotechnology for genetic improvement of Indian coffe. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 3., 1999, Londrina. **Proceedings...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p.247-250.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of coffea. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.19, n.4, p.509-514, 1970.

STARITSKY, G.; VAN HASSELT, G.A. The synchronized mass propagation of *Coffea Canephora in vitro* In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 9., 1980, Londres. **Anais...** Paris: ASIC, 1980. p.597-602.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.2, p.234-238, Mar. 1998.

- 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 Patel, 1984. p.49-60.
- TISSERAT, B.; ESAN, B.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Review**, v.1, p.1-78, 1979.
- TISSERAT, B. ;VANDERCOOK, C.E. Development of an automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.5, p.107–117, 1985.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. 864p.
- TROJER, H. La investigación agro climatológica para el cultivo Del café en Colombia. Centro Nac. Inv. Café, Colombia. **Bol. Irif.**, v.17, p.78-101, 1956.
- TSUKAHARA, M., KOMAMINE, A. Separation and analysis of cell type involved in early stages of carrot somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.47, p.145-151, 1997.
- VALIO, I.F.M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal Experimental of Botany**, Orford, v.27, n.100, p.983-999, Oct./Nov. 1976.
- VALLONE, H.S. **Produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes com polímero hidrorretentor, diferentes substratos e adubações**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant cell Tiss. Org. Cult.**, v.44, p.4-17, 1996.
- VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p.101-103.
- VASIL, V.; VASIL, I.K. Characterization of na embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, Graminae). **American Journal of Botany**, v.69, n.9, p.1441-1449, 1982.

VASIL, V.; VASIL, I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. **Journal Plant Physiology**, v.1234, p.399-408, 1986.

VASIL, V.; VASIL, I.K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* (Gramineae). **American Journal of Botany**, v.71, n.1, p.158-161, 1984.

VIEIRA, L.G.E.; KOBAYASHI, A.K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas, MG. **Palestras...** Brasília: Embrapa Café, 2000. 374p.

WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster, Pennsylvania, Costel and Co. 1943. 273p.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells in embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, n.3, p.443-462, 1986.

YASUDA, T.; FUGII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embiogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiology**, v.26, p.595-597, 1985.

YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.14, p.73-79, 1968.

ZAMARRIPA, A. et al. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café, Cacao e Thé**, v.35, n.4, p.233-244, 1991.

ZEMKE, J.M. et al. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta enxertos de videira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.11, p.1309-1315, 2003.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, n.10, p.1411-1423, Oct. 1993.