

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM
Coffea arabica L. cv. ACAIÁ CERRADO

ALBA REGINA PEREIRA

2005

59172
050449

ALBA REGINA PEREIRA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Coffea arabica* L. cv. ACAIÁ
CERRADO**

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

Orientador
Prof. Dr. Samuel Pereira de Carvalho.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Pereira, Alba Regina

Embriogênese somática direta em *Coffea arabica* L. cv. Acaiaí
Cerrado / Alba Regina Pereira. -- Lavras: UFLA, 2005.
60 p.: il.

Orientador: Samuel Pereira de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Café. 2. Regulador de crescimento. 3. Propagação vegetativa. 4.
Enraizamento. 5. Sacarose. 4. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-633.7323

ALBA REGINA PEREIRA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Coffea arabica* L. cv. ACAIÁ
CERRADO**

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


APROVADA em 18 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Moacir Pasqual

UFLA

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra

EMBRAPA Florestas



Prof. Dr. Samuel Pereira de Carvalho
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.

Agradeço

Aos meus pais, Regina e Carlos, pelo apoio, confiança e incentivo à minha formação. À minha avó Zilda pela força, carinho e amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e a CAPES, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao professor Samuel Pereira de Carvalho, pela orientação, ensinamentos e amizade durante todo curso.

Ao professor Moacir Pasqual, pela amizade e co-orientação.

Ao Pesquisador Leonardo, pela colaboração e amizade.

Aos laboratoristas Vantuil, Antônio Carlos, Antônio Clarete e Evaldo, pela colaboração na condução dos experimentos e ensinamentos.

À Chrystiane Fráguas pela amizade e incentivo.

Ao Victor e família, pelo carinho.

À Flávia Santos e Francinely de Assis, pela preciosa ajuda na realização dos experimentos e pela amizade.

Às amigas Ester, Juliana, Cida, Marina, Camila, Mariana, Isabela, Priscilla Marciano, Juliana Cristina, Renata e Karen Sato.

Aos colegas de curso Adriano, Fabíola, Louise, Fernanda, Leila, Keize, Milene, Luzia, Renata, Adriana, Alysson, Márcia, Neiva, Cristiane, Joyce, Ludimila, Michely, Zé Sérgio, pelo convívio e amizade.

Aos meus tios e primos, pelo carinho.

Enfim, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes nessa etapa da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Aspectos gerais da cafeicultura brasileira.....	03
2.2 Principais cultivares de <i>Coffea arabica</i> no Brasil.....	04
2.2.1 Cultivar Acaiá.....	06
2.3 Cultura de tecidos vegetais.....	07
2.4 Embriogênese somática em <i>Coffea arabica</i> L.....	11
2.5 Aclimatização de mudas de cafeeiro micropropagadas.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Fase de cultivo <i>in vitro</i>	21
3.1.1 Indução de embriões somáticos.....	24
3.1.2 Desenvolvimento de embriões somáticos.....	24
3.1.3 Obtenção de plântulas.....	25
3.2 Fase de aclimatização.....	26
3.2.1 Presença ou ausência de raízes na aclimatização de plântulas.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Indução de embriões somáticos.....	28
4.2 Desenvolvimento de embriões somáticos.....	36
4.3 Obtenção de plântulas de cafeeiro.....	41
4.4 Presença ou ausência de raízes na aclimatização de plântulas.....	46
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS.....	58

RESUMO

PEREIRA, Alba Regina. **Embriogênese somática direta em *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado.** 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A inexistência de metodologia para a propagação vegetativa de *Coffea arabica* L. em escala comercial tem sido a maior restrição ao emprego desta técnica para o uso de híbridos de cafeeiros obtidos pelo melhoramento genético. A técnica de cultura de tecidos é uma opção viável para a obtenção de grande número de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de embriogênese somática direta em *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado. Na indução direta de embriões somáticos avaliou-se a influência de cinetina (0; 1; 2; 4 e 8mg L⁻¹) x GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10 e 20mg L⁻¹) em segmentos foliares, oriundos de plântulas estabelecidas *in vitro*, com tamanho médio de 1cm². Avaliou-se a influência de sacarose (0; 30; 60; 90 e 120g L⁻¹) x BAP (0; 2; 4 e 8mg L⁻¹) em embriões somáticos oriundos da embriogênese direta. No desenvolvimento das plântulas, testaram-se ANA (0; 0,25; 0,5 e 1mg L⁻¹) x GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10 e 20 mg L⁻¹) em brotações, com tamanho médio de 1 a 1,5cm, oriundas de embriões somáticos *in vitro*. Durante a etapa de indução de embriões, o experimento foi conduzido em sala de crescimento em condições de obscuridade e, na etapa de desenvolvimento dos embriões e plântulas, os explantes foram submetidos à irradiância em torno de 32μM m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas. Na aclimatização, avaliou-se o efeito da presença e ausência de raízes em plântulas de cafeeiro oriundas de embriogênese somática direta. A ação combinada entre cinetina (5,6mg L⁻¹) e GA₃(10mg L⁻¹) estimula a indução de embriões somáticos pela via direta. A adição de 90g L⁻¹ de sacarose e 2mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura proporciona melhor crescimento *in vitro* de embriões de cafeeiro. Utilizando-se 0,5mg L⁻¹ de ANA e 14,2mg L⁻¹ de GA₃ obtém-se maior comprimento da parte aérea de brotações de *C. arabica* L. cv. Acaia Cerrado. O enraizamento de brotações de cafeeiro cultivar Acaia Cerrado pode ocorrer simultaneamente ao processo de aclimatização.

*Orientador: Samuel Pereira de Carvalho - UFLA (Orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, Alba Regina. **Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado.** 2005. 60 p. Dissertation (Master Program in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The inexistence of a methodology for the vegetative propagation of *Coffea arabica* L. in a commercial scale has been the largest limiting factor for the employment of new hybrid coffee plants obtained by genetic breeding. Tissue culture technique is a viable option to obtain a great number of disease free plants with a high genetic quality, in a short period of time. This work aimed to establish a protocol for direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado. In the direct induction of somatic embryos, the kinetin influence was evaluated in concentrations ranging (0; 1; 2; 4 and 8mg L⁻¹) combined with GA₃ (0; 2.5; 5.0; 10 and 20mg L⁻¹) in leaf segments, originated from *in vitro* established plantlets, with an average size of 1cm². The sucrose influence was evaluated in concentrations of (0; 30; 60; 90 and 120g L⁻¹) in association with BAP (0; 2; 4 and 8mg L⁻¹), in somatic embryos originated from direct embryogenesis. In order to test the superior development of the plantlets, different ANA concentrations were tested (0; 0.25; 0.5 and 1mg L⁻¹) in association with GA₃ (0; 2.5; 5.0; 10 and 20 mg L⁻¹) in buds with an average size from 1 to 1.5cm, originating from somatic embryos *in vitro*. During the induction phase of the embryos, the experiment was carried out in a culture room, with total absence of light. In the development stage of the embryos and plantlets, the explantes were submitted to a light intensity of 32μmol m⁻² s⁻¹, 25 ± 1°C and photoperiods of 16 hours. In the acclimatization phase, the evaluations were made on the effect of the presence and absence of roots in coffee plantlets originated from direct somatic embryogenesis. The combined effect of kinetin (5.6mg L⁻¹) and GA₃ (10mg L⁻¹) stimulated the induction of somatic embryos in a direct way. The addition of 90g L⁻¹ of sucrose and 2mg L⁻¹ of BAP to the culture medium provided better *in vitro* growth of coffee embryos. When using 0.5mg L⁻¹ of ANA and 14.2mg L⁻¹ of GA₃, longer lengths of the aerial part of the buds of *C. arabica* L. cv. Acaia Cerrado were obtained. Rooting of coffee buds of the Acaia Cerrado cultivar can happen simultaneously to the acclimatization process.

* Guidance: Samuel Pereira de Carvalho - UFLA (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial de café há, pelo menos, 150 anos.

Além de sua importância econômica, a cultura do cafeeiro tem importante função social, pois é geradora de grande número de empregos, diretos e indiretos, sendo responsável pela fixação de grande parte da população na zona rural.

A cafeicultura tem sido grandemente beneficiada pelo sucesso dos programas de melhoramento genético, que têm colocado à disposição dos cafeicultores cultivares mais adaptadas, produtivas e que atendem às necessidades dos consumidores. Entretanto, o melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais, principalmente hibridação, retrocruzamentos e cruzamentos interespecíficos, seguidos da seleção de populações, avaliação de progênies, é um processo demorado, podendo levar mais de trinta anos para se obter uma nova cultivar. 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.

Nesse contexto, a propagação vegetativa é indicada para a multiplicação de cultivares de alta produtividade e resistentes a enfermidades, garantindo uniformidade nos povoamentos e mantendo o ganho genético obtido na seleção. No entanto, a multiplicação vegetativa pelos métodos convencionais deve limitar-se à utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, em que o número é sempre limitado para um clone recentemente selecionado. Em contrapartida, as dificuldades de multiplicação podem ser minimizadas por meio da propagação vegetativa *in vitro*.

As técnicas de cultivo *in vitro* têm possibilitado a obtenção de grande número de plantas em curto espaço de tempo e garantia da uniformidade genética do material. Assim, essa técnica é vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas ou híbridos F_1 que possuam pouco material disponível e necessitam ser propagadas rápida e massivamente, com a finalidade de produção de mudas.

Um importante método de multiplicação *in vitro* de plantas de *Coffea* é a embriogênese somática, que consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células haplóides ou somáticas diplóides sem que haja a fusão de gametas e que possibilita micropropagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos.

Alguns protocolos de embriogênese somática já foram estabelecidos, porém, há necessidade de otimização da técnica para que esta torne viável a produção de mudas em escala comercial.

Objetivou-se, com este trabalho, estabelecer um protocolo de embriogênese somática direta de *Coffea arabica* cultivar Acaiá Cerrado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cafeicultura brasileira

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, na qual destaca-se o gênero *Coffea*, com cerca de 100 espécies. As mais importantes são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pr., representando praticamente todo café produzido e comercializado no mundo, com cerca de 70% de café arábica e 30% de robusta, respectivamente (Guimarães et al., 2002).

A espécie *C. arabica* é nativa do nordeste da África, em uma área que compreende o sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, sendo atualmente cultivada em regiões tropicais com altitudes acima de 500 metros. Esta espécie é a única tetraplóide ($2n = 44$) e autógama do gênero, com 10% a 12% de fecundação cruzada. A ausência de efeitos deletérios causados por autofecundações sucessivas e a baixa porcentagem de alogamia fazem com que sua forma predominante de propagação seja feita por sementes (Vieira & Kobayashi, 2000). Apresenta raiz pivotante curta e grossa, freqüentemente múltipla (Rena & Maestri, 1986) e raízes secundárias ramificadas. O caule único e os ramos ortotrópicos podem dar origem às folhas e também aos ramos plagiotrópicos, os quais dão origem às folhas e aos botões florais. As folhas apresentam coloração verde-escuro, são elípticas e apresentam lâminas brilhantes e domáceas visíveis. Os frutos são drupas, de cor amarela ou avermelhada, possuindo superfície lisa, exocarpo delgado, mesocarpo carnoso e endocarpo fibroso. O endosperma possui uma película prateada e na base aloja-se o embrião (Maciel, 2001).

A espécie *C. arabica* é a de maior importância econômica para o Brasil, que está classificado como maior produtor, exportador e segundo maior consumidor de café do mundo. No país, aproximadamente dez milhões de

trabalhadores envolvem-se direta ou indiretamente com a cultura, em todos os segmentos do setor, desde a produção até a comercialização e industrialização (Mendes, 1997).

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

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

2.2 Principais cultivares de *Coffea arabica* no Brasil

A introdução do cafeeiro no Brasil foi realizada em 1727, quando o Sargento Francisco de Mello Palheta introduziu pequena quantidade de sementes e mudas na região norte do país, mais precisamente em Belém, no estado do Pará. A variedade introduzida foi a *Typica* e, posteriormente, em 1845, foi introduzida a variedade *Bourbon Vermelho* e em 1850, a variedade *Sumatra* (Guimarães et al., 2002).

Até o início do ano de 1930, o melhoramento genético do cafeeiro era feito apenas com introduções de novos germoplasmas, importados de outros países e o processo de seleção não utilizava técnicas científicas, sendo, por isso, considerado 'empírico'. Foi a partir de 1933, com a criação da Seção de

Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que o melhoramento genético do cafeeiro no Brasil passou a ser conduzido de maneira científica. Foi estabelecido um amplo projeto de pesquisas, cujo objetivo era a obtenção de plantas com alta capacidade produtiva, vigorosas, com resistência às doenças e insetos pragas e boas características físicas e químicas do grão (Mendes & Guimarães, 1997).

Nos primeiros trabalhos, avaliaram-se progênes das variedades em uso, notadamente Bourbon Vermelho, Bourbon Amarelo e Sumatra. Posteriormente, progênes foram selecionadas nesses materiais e lançadas para plantio comercial, o que já constituiu um ganho para a cafeicultura.

A partir de 1940, grandes avanços foram obtidos pelo programa de melhoramento genético do IAC, com a seleção da cultivar Mundo Novo (em lavoura comercial, como produto de um provável cruzamento natural entre as variedades Sumatra e Bourbon Vermelho) e, nos anos de 1950 e 1960, com a obtenção da cultivar Catuaí (pela hibridação artificial entre as cultivares Mundo Novo e Caturra Amarelo). A cultivar Icatu, resistente à ferrugem, foi obtida em 1950, pela hibridação artificial entre uma planta de *Coffea arabica* (cultivar Bourbon Vermelho) e uma de *Coffea canephora*. Outro trabalho iniciado pelo IAC e concluído pelo sistema estadual de pesquisa em Minas Gerais foi o de obtenção da cultivar Rubi. Realizando-se retrocruzamentos dessa cultivar com a Mundo Novo, obteve-se excelente vigor vegetativo e maior produtividade (Guimarães et al., 2002).

A partir de 1970, praticamente todo o parque cafeeiro brasileiro passou a ser constituído por linhagens selecionadas nas cultivares Mundo Novo e Catuaí.

A cultivar Acaí foi selecionada dentro de plantas da cultivar Mundo Novo, que apresentaram sementes de maior tamanho e boa capacidade produtiva. Essa cultivar, descrita a seguir, foi selecionada por apresentar

reduzido diâmetro de copa e arquitetura adequada, a qual vem despertando o interesse dos cafeicultores para o plantio adensado.

2.2.1 Cultivar Acaiá

Dentro da cultivar Mundo Novo foram selecionadas plantas com frutos de sementes grandes. Acredita-se que esse fenótipo tenha sido herdado da cultivar Sumatra, integrante do cruzamento que originou a cultivar Mundo Novo (Guimarães et al., 2002). Apresenta-se com boa produção de café beneficiado e boa rusticidade. A altura média das plantas chega a atingir 4,2m e o diâmetro médio da copa é de 1,8m. A cor da brotação nova é geralmente bronze e os ramos secundários são menos abundantes que nas demais cultivares de Mundo Novo. A esse material foi dado o nome de Acaiá, termo originado do guarani, que significa exatamente “frutos com sementes grandes”.

Em Minas Gerais, em 1995, foi lançada uma cultivar derivada da Acaiá, que recebeu a denominação de Acaiá Cerrado. O trabalho, realizado durante quase 30 anos pelo Sistema Estadual de Pesquisa Agropecuária (EPAMIG-UFLA-UFV), teve início em Viçosa, com a seleção de plantas individuais na progênie LCP-474-1, que se mostrava muito heterogênea para vários caracteres de interesse. Por meio da seleção entre e dentro de progênies, o material foi avançado e as avaliações realizadas principalmente na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba de Minas Gerais (região do “Café do Cerrado”). Ao final de cinco ciclos de seleção, chegou-se à cultivar Acaiá Cerrado, que vem exibindo excelente desenvolvimento vegetativo, com elevadas produções, mesmo em condições de solos menos férteis. A altura média é inferior à do Acaiá tradicional, em média 3,1m, com diâmetro de copa de 1,88m (Guimarães et al., 2002).

De acordo com os mesmos autores, todas as seleções de Acaia e Acaia Cerrado têm despertado o interesse dos cafeicultores para o plantio adensado, em razão do seu reduzido diâmetro de copa e arquitetura adequada. São usados espaçamentos entre 1,7 a 2,0m entre linhas e 0,5 a 1,0m entre plantas. Embora o material tenha porte alto, com o manejo por meio de podas programadas (a cada 4 a 5 colheitas), tem sido possível obter altas produtividades nessas condições de plantio. No sistema convencional, para o livre crescimento, os espaçamentos mais indicados se assemelham àqueles recomendados para a cultivar Mundo Novo, podendo apenas ser um pouco mais reduzido o espaçamento entre linhas.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de assepsia, em um meio nutritivo artificial (Pasqual, 2001a). Estas culturas são tratadas adequadamente por meio de balanço nutricional e hormonal, estabelecendo-se condições ambientais bem controladas (Bandel et al., 1975). O princípio básico da cultura de tecidos é a 'totipotencialidade' das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa e com constituição idêntica à da planta matriz (Pasqual, 2001a).

As técnicas de cultivo de tecidos e células vegetais *in vitro* têm sido consideradas como complementares aos métodos convencionais de melhoramento genético. Por meio de técnicas como cultura de embriões, de anteras, de protoplastos, de células somáticas e da manipulação genética *in vitro*, têm-se obtido resultados promissores na obtenção mais rápida de genótipos superiores.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala, sendo importante principalmente para as culturas de ciclo longo (Andrade, 1998).

Os meios de cultura, por consistirem de uma parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia. Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes. Um grande passo foi dado em 1962, com a publicação do trabalho de Murashige & Skoog, os quais determinaram a concentração de sais, estabelecendo o meio 'MS' (Pasqual, 2001b).

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

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, os quais são sintetizados em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas. Eles são distribuídos em diferentes órgãos, nos quais exercem suas funções, inibindo ou estimulando processos fisiológicos e ou bioquímicos vitais. Esses fitormônios podem ser sintetizados em laboratório e são denominados de substâncias reguladoras de crescimento ou fitorreguladores (Taiz & Zeiger, 2004).

Na cultura de tecidos, a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. Combinações entre essas substâncias propiciam melhor crescimento e desenvolvimento do explante (Andrade, 1998).

Segundo Skoog & Miller (1957), um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* sendo, conseqüentemente, os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos.

As auxinas promovem o crescimento do caule, folhas e raízes, além de serem responsáveis pela dominância apical (Taiz & Zeiger, 2004). Porém, na fase de multiplicação, para muitas espécies não há a necessidade da adição de auxina ao meio de cultura (Quoirin & Lepoivre, 1977). Neste caso, a auxina pode ser prejudicial devido, provavelmente, a um desbalanço da relação endógena de auxinas e citocininas dos explantes, reduzindo ou inibindo o número de brotações ou favorecendo demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo em detrimento da multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998). Segundo Pasqual (2001b), as principais auxinas utilizadas são: ácido indol acético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol butírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA).


Embora as auxinas não sejam necessárias no cultivo *in vitro* de algumas espécies, as citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Além disso, promovem divisão, alongamento e diferenciação celular e retardam a senescência das plantas (Taiz & Zeiger, 2004). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o tipo de citocinina e a sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para o ajustamento dos meios de cultura.

O BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu & Wang, 1983) e é a citocinina mais utilizada, seguida pela cinetina e 2iP (isopenteniladenina).

Apesar de a citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, por excessivo número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação (Leshem et al., 1998). Qi-Guang et al. (1986) observaram que altas concentrações de BAP inibiram a brotação das gemas e, conseqüentemente, o número de partes aéreas, promovendo a formação de calo em *Castanea mollissima*.

As giberelinas têm como principal efeito em cultura de tecidos o alongamento das brotações durante a multiplicação ou antes do enraizamento. O crescimento e a rediferenciação de calos podem ser promovidos pelas giberelinas, mas isto não é observado em todas as espécies de plantas (Barrueto Cid, 2000). Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico (GA_3) no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. Todavia, quando aplicado em concentrações relativamente elevadas, o ácido giberélico impede a formação de raízes, especialmente se as auxinas forem aplicadas simultaneamente.

Praticamente todas as células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* são heterotróficos e dependem de uma fonte externa de energia. Portanto, torna-se necessário incorporar ao meio de cultura uma fonte de carbono. Os carboidratos fornecem energia e esqueletos de carbono, que são utilizados para a biossíntese de polissacarídeos, aminoácidos e proteínas. A fonte mais comumente utilizada é a sacarose, que pode ser total ou parcialmente hidrolizada em glicose e frutose (Pasqual, 2001b).



A concentração da sacarose varia de acordo com a espécie cultivada *in vitro*, como tem sido observado por diversos autores. Para a maioria das espécies é utilizada a concentração indicada pelo meio 'MS' de 30g L⁻¹ (Caldas et al., 1998).

2.4 Embriogênese somática em *Coffea arabica* L.

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

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é uma das aplicações de mais larga utilização. Destina-se, principalmente, àquelas plantas que são de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo (Pasqual, 2001a).

A micropropagação pode ser conduzida por meio da proliferação de gemas axilares, pela indução de gemas adventícias por organogênese e pela embriogênese somática.

Técnicas de cultura de células e tecidos vegetais foram inicialmente estudadas e estabelecidas para o cafeeiro a partir do trabalho pioneiro de Staritsky (1970), que descreveu a indução de embriões somáticos e plântulas oriundas de ramos ortotrópicos de *Coffea canephora*. Posteriormente, trabalhos

envolvendo espécies de *Coffea 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 (Andrade 1998; Ribeiro 2001). Diversos trabalhos foram realizados utilizando cultura de tecidos para a propagação de variedades comerciais de café, regenerando plantas por meio de neoformação de gemas, de secção de entrenós verdes, de ramos ortotrópicos e por indução de embriogênese somática a partir de explantes foliares (Herman & Hass, 1975; Sondahl & Sharp, 1977; Dublin 1980).

O meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) é o mais utilizado na propagação *in vitro* de *C. arabica*, promovendo resultados positivos na multiplicação de segmentos nodais, desenvolvimento de embriões e indução de embriogênese somática em explantes foliares (Cordeiro, 1999; Ribeiro, 2001).

O cafeeiro, como outras espécies lenhosas, libera substâncias fenólicas e, por esta razão, devem ser adicionadas ao meio de cultura substâncias antioxidantes, como carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (Andrade, 1998).

Dentro das aplicações da micropropagação de plantas destaca-se a embriogênese somática, apresentando grande potencial a ser explorado, capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético (Maciel, 2001).

A embriogênese somática pode ser definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células haplóides ou somáticas diplóides, sem que haja a fusão de gametas (Schultheis et al., 1990). Segundo Sharp et al. (1980), embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: a) direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos de matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos; b) indireta, na qual os embriões somáticos se

formam a partir de calos, que apresentam células em vários estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Guerra et al., 1999).

Em explantes foliares de café, pela via direta, os embriões somáticos originam-se, aparentemente, de células embriogênicas predeterminadas que requerem apenas um regulador de crescimento ou condições favoráveis (Williams & Maheswaran, 1986). No processo de embriogênese somática indireta, os embriões surgem: a) 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; b) calos secundários embriogênicos friáveis, que originam cerca de 100 a 300 embriões/explante, quando cultivados em meio de cultura semi-sólido (Sondahl & Sharp, 1977).

Segundo Vieira & Kobayashi (2000), uma característica diferencial entre estes dois padrões de desenvolvimento embriogênico é a resposta à ação de reguladores de crescimento. Enquanto a embriogênese direta caracteriza-se pelo cultivo dos explantes em um único meio de cultura com a adição de apenas uma citocinina, a indireta requer alta relação auxina/citocinina para a formação de calos não diferenciados em um meio de cultura inicial e baixa relação para a indução de calos embriogênicos durante culturas subseqüentes.

Os primeiros trabalhos conhecidos de embriogênese somática no gênero *Coffea* foram realizados por Starisky (1970), que obteve rápida proliferação de calos na espécie *C. arabica* e embriões e plântulas com explantes de *C. canephora*. Desde então têm sido desenvolvidas pesquisas sobre a embriogênese somática no cafeeiro em diversos países (Cordeiro, 1999; Sreenath, 2000).

Segundo Dublin (1991), o surgimento dos primeiros embriões, a taxa de embriogênese (porcentagem de explantes que produzem embriões) e o número

de embriões produzidos por explante dependem de vários fatores, como origem e tamanho do explante, composição do meio de cultura e reguladores de crescimento, órgão fornecedor de explante, idade e época do ano em que é colhido o material propagativo da planta doadora.

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

A indução da embriogênese somática em explantes vegetais, assim como a multiplicação e crescimento de plântulas, é altamente dependente da composição dos nutrientes minerais no meio de cultura (Monteiro-Hara, 2000). Normalmente são empregados pelo menos dois diferentes meios de cultura, sendo o primeiro otimizado visando à indução da embriogênese somática, enquanto o segundo meio permite o desenvolvimento dos embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

A sacarose tem sido a fonte de carboidratos mais usada no cultivo *in vitro* de cafeeiro, embora outros mono e dissacarídeos possam ser utilizados. A concentração de sacarose influencia nos processos de iniciação e de diferenciação dos embriões, uma vez que o seu metabolismo em plantas é regulado por um grupo de genes por meio das enzimas sacarose sintetase e sacarose invertase, cujas respostas são moduladas de acordo com a variação de sua concentração (Guerra et al., 1999).

Maciel et al. (2003), trabalhando com embriogênese somática indireta em cafeeiro cv. Obatã observaram que a utilização de 30g L^{-1} de sacarose no meio de cultura promoveu uma média de 202 embriões globulares e cordiformes até o máximo de $3,3\text{mg L}^{-1}$ de BAP, registrando-se redução na presença de concentrações mais elevadas. Para embriões cotiledonares, os melhores resultados foram alcançados utilizando-se 45g L^{-1} de sacarose, combinados com

2,0mg L⁻¹ da citocinina BAP. Entretanto, Pereira et al. (2002), estudando a formação de embriões somáticos indiretos de cafeeiro cv. Acaia Cerrado cultivado sob diferentes concentrações de BAP e sacarose, observaram que o melhor resultado, tanto para embriões globulares como para cordiformes, foi obtido utilizando 8,0mg L⁻¹ de BAP associados a 60g L⁻¹ de sacarose, proporcionando um total de 247 embriões formados.

As auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. Algumas 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 estabelecido o processo de indução (Maciel, 2001).

Embora a maioria dos trabalhos em micropropagação de café por meio da embriogênese somática direta 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. Apesar de não haver estudos específicos determinando a relação entre variação somaclonal e o tipo de embriogênese somática, Michaux-Ferriere & Schwendiman (1992) apontam que, em comparação ao sistema indireto, o risco de ocorrência de variantes somaclonais no sistema de embriogênese direta seria menor em função do tempo relativamente mais curto em cultura requerido para a formação de embriões. Dublin (1981) também levantou a possibilidade de que a propagação de café via embriogênese somática direta pode manter com maior segurança a estabilidade do genótipo doador.

Os trabalhos pioneiros desenvolvidos na tentativa de eliminar ou diminuir a formação de calos em cafeeiro foram relatados por Staritsky & 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 embriões e que as auxinas favorecem a formação de calos.

Estudando os efeitos de vários reguladores de crescimento na indução da embriogênese somática direta a partir de folhas de *C. canephora*, Hatanaka et al. (1991) demonstraram que as auxinas ANA, AIB, AIA e 2,4-D são altamente inibitórias para a formação dos embriões. Por outro lado, na ausência de auxinas no meio de cultura, todos os tipos de citocinina testadas foram capazes de estimular o desenvolvimento de embriões somáticos, sendo que 2-iP, na concentração de 5mM, foi a mais efetiva.

Nakamura et al. (1992), utilizando somente cinetina como regulador de crescimento, observaram uma pequena proliferação de calos nas bordas dos explantes foliares e, após 60-90 dias, foi possível verificar embriões somáticos oriundos desses calos embriogênicos. Utilizando explantes derivados de folhas maduras, esta formação de calos não ocorreu. É possível que, em tecidos de folhas jovens, auxinas endógenas estejam presentes em quantidades suficientes para permitir a formação dessa pequena massa de calos e a regeneração de embriões.

Segundo Vieira & Kobayashi (2000), *C. canephora* tem sido utilizada como espécie modelo na grande maioria dos trabalhos em embriogênese direta. Existe grande diferença entre *C. canephora* e *C. arabica* quanto à indução de embriogênese direta em explantes foliares. Para a primeira, é relativamente fácil desencadear a formação de embriões somáticos em meio de cultura suplementado somente com citocininas (Fuentes et al., 2000), mas há poucos

relatos da obtenção de embriogênese somática direta em *C. arabica*. A diferente resposta entre espécies e entre cultivares, aliada a baixa frequência de formação de embriões, indica que este sistema ainda não apresenta grande potencial para ser utilizado em processos de produção de mudas de cafeeiro em larga escala. Em contrapartida, provavelmente, as plantas serão idênticas à planta matriz.

Apesar da variabilidade genotípica para a resposta aos protocolos de embriogênese somática encontrada em diversas cultivares de café, principalmente de *C. arabica*, esta técnica tem sido fundamental para a obtenção de plantas de cafeeiro transformadas tanto via *Agrobacterium* quanto via bombardeamento de partículas (Ribas et al., 2001).

2.5 Aclimatização de plântulas de cafeeiro micropropagadas

Aclimatização é o processo pelo qual as plântulas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente em condições climáticas naturais ou de transição, como a casa de vegetação. Esta fase deve ocorrer progressivamente de forma que as plântulas sofram pouco estresse, evitando injúrias ou até mesmo a morte (Brainerd & Fuchigami, 1981).

Segundo Read & Fellman (1985), um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos na propagação de plantas é a dificuldade de transferir com sucesso as plântulas da condição *in vitro* para a casa de vegetação e para o campo, devido à grande diferença entre as condições ambientais.

O principal fator limitante na aclimatização é o baixo rendimento, ou seja, produz-se um número muito grande de plântulas micropropagadas em sala de crescimento, entretanto há perdas significativas quando estas são transferidas para outro ambiente. Dessa forma, poucas estarão em condições de serem

levadas ao campo. Assim, cada planta apta para o plantio apresentará alto custo que, inevitavelmente, será repassado para o consumidor final.

É no período de aclimatização que a plântula vai começar a ativar seus fotossistemas I e II e a formação de cloroplastos, responsáveis pela transformação de energia luminosa em química, entre outros fatores fisiológicos, para que todo este processo seja perfeito e a planta se constitua de todas as suas estruturas funcionais, essenciais para seu desenvolvimento (Carvalho, 1997).

Segundo Sutter (1988), no transplântio, o estresse hídrico das plântulas é, geralmente, o maior problema. Embora as plântulas sejam aparentemente perfeitas, elas apresentam uma série de deficiências anatômicas, induzidas pela condição *in vitro*, que dificultam o controle da transpiração e ocasionam rápida perda de água. Entre essas deficiências estão: pobre formação de cera epicuticular e deficiência no mecanismo de fechamento estomático (Sutter, 1988), aumento na densidade estomática (Wetzstein & Sommer, 1982), localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha (Capellades et al., 1990), reduzida diferenciação do mesofilo das folhas e alta proporção de espaços intercelulares (Capellades et al., 1990; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997) e deficiente conexão entre o sistema vascular do caule e raízes (Grout & Aston, 1977).

Vários fatores são limitantes durante a fase de aclimatização: 1) a plântula passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa intensidade de luz e à elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito susceptível ao estresse hídrico; 2) a plântula passa de uma existência heterotrófica, na qual depende de um suprimento externo de energia (sacarose no meio), para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver; 3) a plântula passa a ter que incrementar a absorção de sais rapidamente e 4) a plântula passa

de um ambiente asséptico para outro, no qual fica sujeita ao ataque de microrganismos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Visando reduzir as perdas durante a fase de aclimatização, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para favorecer o crescimento das plântulas nessa fase limitante da cultura de tecidos (Araujo, 2004). Preece & Sutter (1991) citam que as técnicas de aclimatização podem ser iniciadas ainda durante o cultivo *in vitro*. Segundo Fráguas (2003), um método eficiente que é utilizado, é destampar os recipientes por alguns dias antes da transferência das plântulas para a casa de vegetação.

Outro fator que pode favorecer a aclimatização é o enraizamento *in vitro*, embora alguns autores citem que o sistema radicular formado *in vitro* é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares, o que dificulta a absorção de água e nutrientes durante a aclimatização, reduzindo a taxa de sobrevivência das plântulas (Leite, 1995; Zimmerman, 1981; Grout & Aston, 1977). Além disso, as raízes que se desenvolvem *in vitro* são passíveis de serem danificadas quando as plântulas são removidas da cultura ou quando são transplantadas e isso aumenta as chances de infecção com doenças fúngicas e bacterianas (George, 1996). Entretanto, alguns autores comprovam a eficiência do sistema radicular formado *in vitro* e o aumento da sobrevivência após transferência para condições *ex vitro* (Hicks, 1987; Sutter & Luza, 1993; Díaz-Pérez et al., 1995).

As auxinas compreendem o grupo de fitorreguladores com maior efetividade na promoção do enraizamento e o AIB é a auxina sintética mais comumente utilizada na indução do enraizamento adventício (Teixeira, 1981).

O tratamento de segmentos caulinares com reguladores de crescimento acelera consideravelmente o processo de enraizamento e induz maior formação de raízes. Entretanto, em algumas espécies, o tratamento com fitorreguladores

4

pode ser dispensado, bastando apenas transferir os segmentos para um meio isento destes (George, 1996).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o tipo de sistema radicular obtido no enraizamento *in vitro* influi no sucesso de transplântio. Raízes ainda curtas são mais desejáveis, pois facilitam o transplântio e aceleram o pegamento. Parte aérea muito grande e sistema radicular pouco desenvolvido contribuem para a morte da planta, pois o sistema radicular não irá suprir a taxa de transpiração (Carvalho et al., 1998).

Carvalho (1997), avaliando o efeito de reguladores de crescimento e presença ou ausência de raízes na aclimatização de plântulas de cafeeiro propagadas *in vitro*, observou que houve 100% de enraizamento em todos os tratamentos testados, indicando que a aclimatização de plântulas de cafeeiro pode ser feita sem a necessidade do enraizamento *in vitro*. A eliminação dessa etapa é extremamente desejável sob o aspecto econômico e de qualidade, pois a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

3.1 Fase de cultivo *in vitro*

No preparo dos meios de cultura foram utilizadas soluções-estoque do meio 'MS' (Tabela 1) armazenadas em frascos de vidro escuro, a temperaturas em torno de 5°C. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, com NaOH 0,5 e 0,1N ou HCl 0,1N, antes da adição de 6g L^{-1} de ágar. Os meios foram vertidos em tubos de ensaio (25mm x 150mm), vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,1atm e à temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

Os explantes de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado foram inoculados em câmara de fluxo laminar horizontal desinfestada com álcool (etanol) a 70%. Os instrumentos (pinças e bisturis) foram autoclavados e periodicamente flambados, durante o seu uso, com etanol 96°GL. Após a inoculação, os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a avaliação das variáveis respostas dos experimentos foram utilizadas: a) lupa estereoscópica, na determinação do número e estádios de desenvolvimento dos embriões, b) balança analítica de precisão, na determinação da massa fresca da parte aérea das plântulas e c) régua graduada, na determinação do comprimento da parte aérea das plântulas.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste F.

TABELA 1. Solução nutritiva MS (Murashige & Skoog, 1962).

Solução estoque (SE)	Compostos	Concentração da SE (mg L ⁻¹)	Volume da SE adicionada ao meio (mL)	Concentração final (mg L ⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	82500	20	1650,00
B	KNO ₃	95000	20	1900,00
C	H ₃ BO ₃	1240		6,20
	KH ₂ PO ₄	34000		170,00
	KI			
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	166	5	0,83
	CoCl ₂ .6H ₂ O	50		0,25
		5		0,025
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	8800	50	440,00
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74000		370,00
	MnSO ₄ .4H ₂ O	4460	5	22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1720		8,60
	CuSO ₄ .5H ₂ O	5		0,025
F	NaEDTA.2H ₂ O	7450	5	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	5570		27,85
HEXITOL	Mio-Inositol	2000	50	100,00
VITAMINAS	Tiamina - HCl	50		0,50
	Ác. nicotínico	50	10	0,50
	Piridonina- HCl	50		0,50
Aminoácido	Glicina	80	25	2,00
AÇÚCAR	Sacarose (3%)	-	-	30000,00
ÁGAR	0,6%	-	-	6000,00

Os fatores foram analisados por meio de regressão polinomial, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000). Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_k + ab_{ik} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

Y_{ijk} : valor observado na dose do fitorregulador i, dose do fitorregulador k e repetição j;

m: média geral;

a_i : efeito da dose do fitorregulador i;

b_k : efeito da dose do fitorregulador k;

ab_{ik} : efeito da interação entre a dose do fitorregulador i e a dose do fitorregulador k;

e_{ijk} : erro experimental na parcela i,k,j.

3.1.1 Indução de embriões somáticos

Os explantes utilizados foram folhas de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado, com tamanho médio de 1cm², provenientes de partes aéreas de plântulas micropropagadas, originadas de cultura de embriões zigóticos e estabelecidas *in vitro* durante 60 dias, em meio 'MS' 100% dos sais.

Os tratamentos consistiram da combinação de cinco concentrações de cinetina (0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0mg L⁻¹) e cinco concentrações de GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0mg L⁻¹) adicionados ao meio 'MS' com 50% dos sais, 8,0mg.L⁻¹ de ANA, 100mg.L⁻¹ de caseína hidrolisada e 400mg.L⁻¹ de extrato de malte.

Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15mL de meio de cultura. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob condições de obscuridade, com temperatura de 25 ± 1°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5, com quatro repetições de três tubos cada uma.

Após 150 dias, o experimento foi avaliado em função das seguintes variáveis: número total de embriões, número de embriões no estágio torpedado, número de embriões no estágio cotiledonar e comprimento do embrião.

3.1.2 Desenvolvimento de embriões somáticos

Os explantes utilizados foram embriões somáticos de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado, provenientes da embriogênese somática direta, estabelecidos durante 30 dias em meio 'MS' com 100% dos sais, objetivando a homogeneidade do material.

Os tratamentos consistiram da combinação de quatro concentrações de BAP (0; 2,0; 4,0 e 8,0mg L⁻¹) e cinco concentrações de sacarose (0; 30; 60; 90 e

120g L⁻¹) adicionados ao meio 'MS' com 50% dos sais, 100mg L⁻¹ de caseína hidrolisada e 400mg L⁻¹ de extrato de malte.

Os embriões foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15mL de meio de cultura. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 32 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, com quatro repetições de três tubos cada uma.

Após 90 dias, o experimento foi avaliado em função das seguintes variáveis: número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca da parte aérea.

3.1.3 Obtenção de plântulas

Utilizaram-se como explantes brotos de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado com 1 a 1,5cm de comprimento, provenientes de embriões somáticos obtidos por via direta, estabelecidos *in vitro* durante 60 dias em meio 'MS' com 100% dos sais e acrescido de 9mg L⁻¹ de BAP, objetivando a homogeneidade do material.

Os tratamentos consistiram da combinação de cinco concentrações de GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0mg L⁻¹) e quatro concentrações de ANA (0; 0,25; 0,50; 1,0mg L⁻¹) adicionados ao meio 'MS' com 50% dos sais.

Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15mL de meio de cultura. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 32 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, com quatro repetições de três tubos cada uma.

Após 60 dias, o experimento foi avaliado em função das seguintes variáveis: número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca da parte aérea.

3.2 Aclimatização de plântulas

Plântulas de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado, provenientes de embriogênese somática direta, com aproximadamente 2cm de comprimento, 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, com aproximadamente 90% de umidade relativa do ar e temperatura média próxima de 25°C. A bancada ficou protegida na parte superior, acima da tubulação de nebulização e nas laterais com tela de sombreamento 50% (sombrite®), durante o primeiro mês.

3.2.1 Presença ou ausência de raízes na aclimatização de plântulas

Segmentos nodais foram inoculados em meio 'MS' com 100% dos sais, suplementado ou não com AIB conforme os tratamentos. Os explantes permaneceram em sala de crescimento por 35 dias e, após este período, foram divididos em plântulas com raízes oriundas de meio 'MS'+ AIB 10 mg L⁻¹ (CR-AIB), plântulas sem raízes oriundas de meio 'MS' (SR-MS) e imersas em solução contendo AIB na concentração de 50 mg L⁻¹ por 20 horas (SR-AIB). Após o tratamento, foram transferidas para bandejas de isopor contendo Plantmax hortaliças® como substrato e mantidos em casa de vegetação. O fornecimento de minerais foi feito por meio da aplicação semanal de 1mL do

meio 'MS' líquido, com 100% dos sais por plântula, iniciado no dia do plantio e estendendo-se até o final do experimento (comunicação pessoal)*.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e cinco plantas por parcela. Os dados foram submetidos à análise estatística. Após a análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = m + a_i + e_{ij}, \text{ em que:}$$

Y_{ij} : valor observado na parcela para o tratamento i na repetição j ;

m : média geral;

a_i : efeito do tratamento i ;

e_{ij} : erro experimental na parcela i,j .

Após 80 dias, as plântulas foram avaliadas em função das seguintes variáveis: número de pares de folhas, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e massa fresca total.

* Adriana Madeira Santos Jesus, Eng. Agrônoma, M.Sc., D.Sc. – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. DAG/UFLA, Lavras-MG.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de embriões somáticos

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados na Tabela 2. Para a variável comprimento do embrião não houve interação significativa entre os reguladores de crescimento estudados. Para as demais variáveis, a interação entre os reguladores de crescimento foi significativa a 1% de probabilidade.

TABELA 2. Resumo da análise de variância para as características número total de embriões somáticos (NE), número de embriões cotiledonares (NEC), número de embriões torpedo (NET) e comprimento do embrião (CE). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	Quadrados médios				
	GL	NE	NEC	NET	CE
Cinetina	4	515,433**	374,986**	12,486**	1,878**
GA ₃	4	535,833**	383,453**	18,086**	18,589**
Cinetina x GA ₃	16	274,683**	202,578**	15,295**	0,345
Erro	50	13,733	15,013	3,266	0,427
C. V. (%)		17,10	23,12	36,84	20,98

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Número total de embriões somáticos

O efeito das concentrações de cinetina e GA₃ no número total de embriões pode ser observado na Figura 1. Foram formados 45 embriões somáticos em explantes foliares quando se adicionou, ao meio de cultura, cinetina na concentração de 5,6mg L⁻¹ combinada com 10mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 1A). Com a utilização de 5,8mg L⁻¹ de cinetina combinada com 20mg L⁻¹ de GA₃, pode-se observar a formação de 44 embriões somáticos. Dessa forma, como a diferença é mínima, justifica-se a utilização do meio de cultura com a adição de 10mg L⁻¹ de GA₃, com o objetivo de redução de custos. Contudo, concentrações acima de 6mg L⁻¹ de cinetina associadas a 10 e 20mg L⁻¹ de GA₃ promoveram inibição e redução na formação de embriões, provavelmente causada por desbalanço hormonal, da relação endógena entre auxinas e giberelinas dos explantes.

Concentrações superiores a 8mg L⁻¹ de cinetina, quando combinadas com 2,5 e 5,0mg L⁻¹ de GA₃, podem proporcionar um aumento no número de embriões somáticos. Essas mesmas concentrações de GA₃, quando associadas a valores entre 2 e 6mg L⁻¹ de cinetina, reduziram o número de embriões.

O número de embriões somáticos obtidos na ausência da cinetina, em todas as concentrações de GA₃, foi inferior quando comparado aos demais tratamentos, evidenciando-se assim a importância desse fitorregulador para a indução de embriões em *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado. A concentração de 2mg L⁻¹ de cinetina, quando combinada às concentrações de 10mg L⁻¹ e 20mg L⁻¹ de GA₃, também mostrou-se menos eficiente na indução de embriões somáticos. Possivelmente, nesse caso, maiores concentrações de cinetina são requeridas para se obter maior número de embriões somáticos.

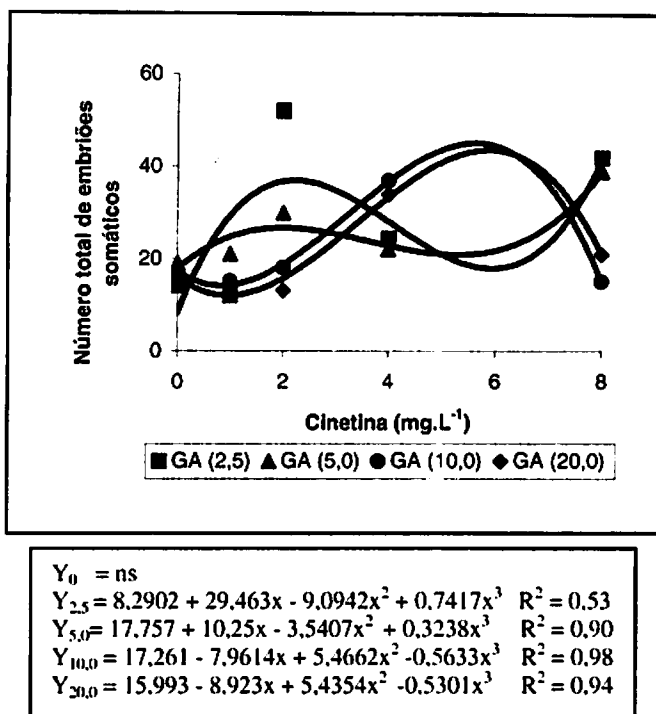


FIGURA 1. Efeito de concentrações de cinetina e GA₃ no número total de embriões somáticos de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Resultados similares foram obtidos por Hatanaka et al. (1991) que, estudando a indução de embriões somáticos a partir da embriogênese direta em folhas de *Coffea canephora*, obtiveram uma média de 100 embriões/explante quando utilizaram cinetina na concentração de 5mg L⁻¹. Demonstraram, ainda, que 2-iP e BAP também foram capazes de estimular o desenvolvimento de embriões somáticos originados por via direta e que as auxinas são altamente inibitórias para a formação de embriões. De acordo com Fuentes et al. (2000), existe uma grande diferença entre *C. canephora* e *C. arabica* quanto à indução de embriogênese direta em explantes foliares. A variação entre espécies

observadas, com relação à maior ou menor habilidade natural em formar embriões somáticos, tem demonstrado a importância do controle genético. Tal fato tem dificultado o estabelecimento de protocolos gerais e funcionais de embriogênese (Vieira & Kobayashi, 2000).

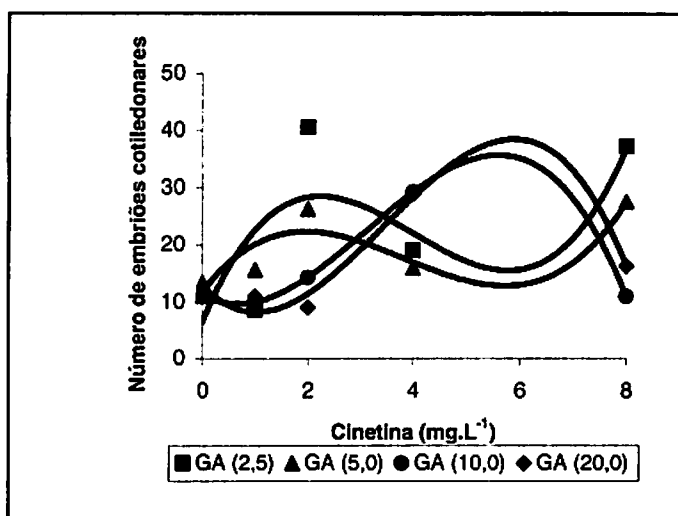
Segundo Caldas et al. (1998), poucas culturas *in vitro* mostram respostas às giberelinas. Porém, no presente trabalho, a adição de 10mg L⁻¹ e 20mg L⁻¹ de GA₃ ao meio de cultura, combinada à cinetina (5,6 e 5,8mg L⁻¹) proporcionou os melhores resultados para o número de embriões somáticos de *C. arabica* cv. Acaiaí Cerrado. Kochba et al. (1974), trabalhando com *Citrus sinensis*, observaram aumento na porcentagem de embriões somáticos quando adicionaram ao meio de cultura o GA₃. Em muitas plantas, diferenciação dos calos em embriões somáticos foi produzida por giberelinas (Barrueto Cid, 2000).

De acordo com Carvalho et al. (1998), o GA₃ contribui para o desenvolvimento de embriões de cafeeiro.

O número de embriões somáticos diretos de *C. arabica* cv. Acaiaí Cerrado obtido no presente trabalho, utilizando cinetina e GA₃, foi inferior quando comparado aos resultados de embriogênese indireta em *C. arabica* cv. Obatã obtidos por Maciel et al. (2003), os quais obtiveram proliferação de calos utilizando 2,4-D e cinetina, alcançando, na etapa posterior, uma média de 310 embriões/explante. Este comportamento está de acordo com Vieira & Kobayashi (2000), que asseguram que a embriogênese indireta é preferencialmente utilizada para estudos de multiplicação clonal de plântulas de cafeeiro, pois, geralmente, proporciona a formação de maior número de embriões somáticos/explante. Entretanto, a embriogênese direta pode manter melhor a estabilidade genética do genótipo doador (Dublin, 1981).

Número de embriões cotiledonares

Analisando-se o efeito das concentrações de cinetina e GA₃ no número de embriões cotiledonares (Figura 2), observa-se que a utilização de 20mg L⁻¹ de GA₃, associada a 5,9mg L⁻¹ de cinetina, promoveu a formação de maior número de embriões cotiledonares (38). Porém, concentrações de cinetina superiores a 6mg L⁻¹, associadas a 10 e 20mg L⁻¹ de GA₃, proporcionaram redução no número de embriões, provavelmente devido ao desbalanço hormonal causado por esses reguladores de crescimento. Observa-se, ainda, que concentrações acima de 8mg L⁻¹ de cinetina, quando combinadas com 2,5 e 5,0mg L⁻¹ de GA₃, podem proporcionar um incremento no número de embriões cotiledonares.



$$Y_0 = ns$$

$$Y_{2,5} = 6.3957 + 22.677x - 7.024x^2 + 0.5836x^3 \quad R^2 = 0.57$$

$$Y_{5,0} = 11.813 + 12.094x - 4.1336x^2 + 0.3584x^3 \quad R^2 = 0.78$$

$$Y_{10,0} = 11.303 - 5.0036x + 4.1305x^2 - 0.4387x^3 \quad R^2 = 0.97$$

$$Y_{20,0} = 12.901 - 9.6032x + 5.4847x^2 - 0.5288x^3 \quad R^2 = 0.94$$

FIGURA 2. Efeito de concentrações de cinetina e GA₃ no número de embriões cotiledonares de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.



Segundo Gray (1992), os embriões somáticos que se formam a partir de complexos pró-embrionários tendem a se desenvolver de forma assíncrona, sendo que, em determinado momento, vários estádios ontogênicos (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) são observados nas culturas. Quando o embrião apresenta o desenvolvimento do cotilédone conseqüentemente possui maior tamanho. Nesse estágio podem ser isolados e cultivados em meios de cultura mais simples que contenham menores quantidades de nutrientes.

Comparando-se os resultados do número total de embriões somáticos com o número de embriões cotiledonares, observa-se que as tendências foram idênticas, visto que dos embriões somáticos formados, a maioria foi cotiledonar.

Número de embriões torpedo

Maior número de embriões no estágio torpedo (11) foi formado em explantes foliares quando se adicionou, ao meio de cultura, cinetina na concentração de 8mg L^{-1} combinada com 5mg L^{-1} de GA_3 (Figura 3). Concentrações de cinetina superiores a 8mg L^{-1} , quando combinadas com $2,5\text{mg L}^{-1}$ de GA_3 , podem proporcionar um incremento no número de embriões torpedo. Nessa mesma concentração de GA_3 , quando associada a 2mg L^{-1} de cinetina, pode-se observar a formação de 8,39 embriões.

Na ausência de cinetina, para ambas as concentrações de GA_3 , pode-se observar um menor número de embriões e que, com 5mg L^{-1} de GA_3 , foi maior que com $2,5\text{mg L}^{-1}$. Estes resultados corroboram aqueles obtidos para o número total de embriões somáticos e para os embriões cotiledonares. Consta-se, assim, a importância da utilização da cinetina no meio de cultura para a indução de embriões de cafeeiro.

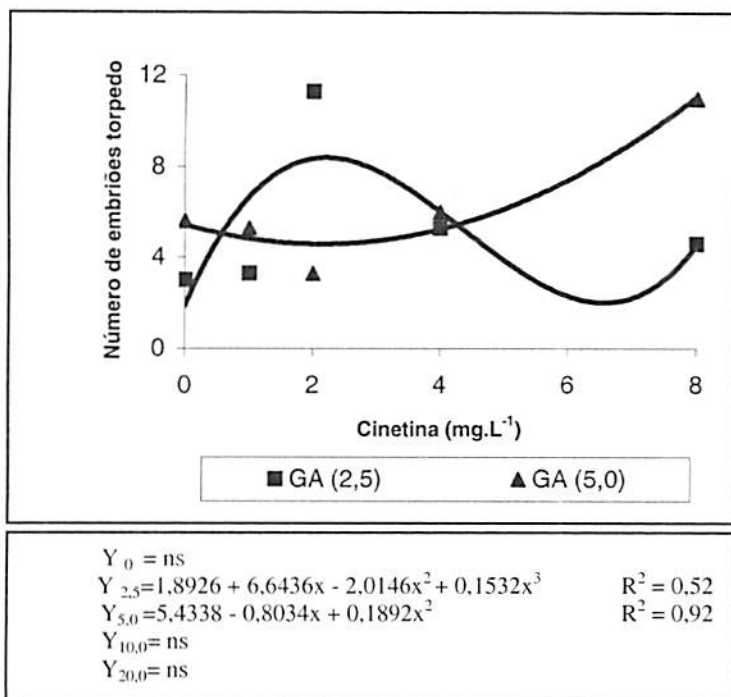


FIGURA 3. Efeito de concentrações de cinetina e GA₃ no número de embriões torpedos de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Comprimento do embrião

Para a variável comprimento do embrião, verifica-se que não houve interação entre as concentrações de cinetina e GA₃ (Tabela 2).

Maior comprimento do embrião (3,6mm) foi observado quando foram utilizados 8mg L⁻¹ de cinetina (Figura 4). Quando utilizaram-se 4mg L⁻¹ de cinetina, obteve-se um comprimento de 3,2mm. Dessa forma, como a diferença é mínima, justifica-se a adição de 4mg L⁻¹ de cinetina ao meio de cultura, com o objetivo de redução de custos. Na ausência de cinetina observou-se que o comprimento do embrião foi inferior a 2,8mm. Segundo Hu & Ferreira (1998),

em cultura de embriões jovens, as citocininas são usadas para estimular o rápido crescimento embrionário.

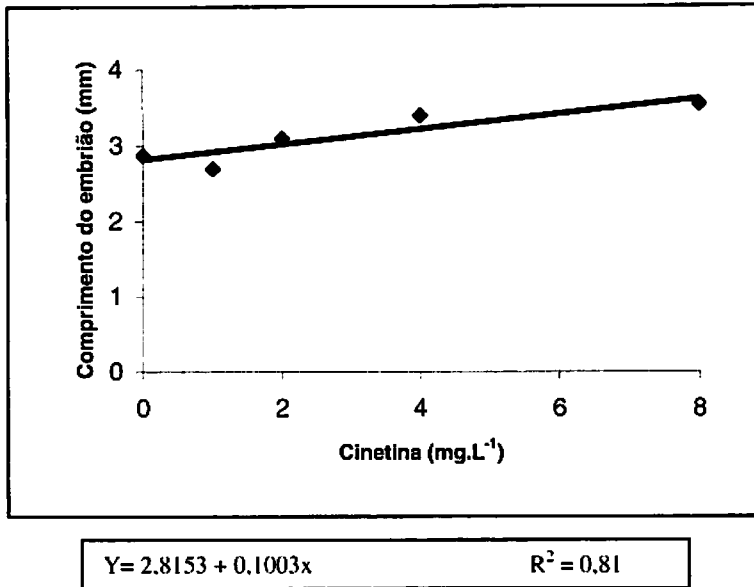


FIGURA 4. Efeito de concentrações de cinetina no comprimento de embriões somáticos da *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

À medida que concentrações de GA₃ foram aumentadas, observou-se aumento no comprimento do embrião (Figura 5) até o valor de 4,47mm, quando utilizaram-se 17mg L⁻¹ de GA₃. A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido ao efeito fitotóxico do regulador de crescimento. Quando o comprimento do embrião formado é muito pequeno, é necessário maior tempo de permanência no meio de cultura e, quando esse é reduzido no laboratório, há otimização da produção e redução de gastos.

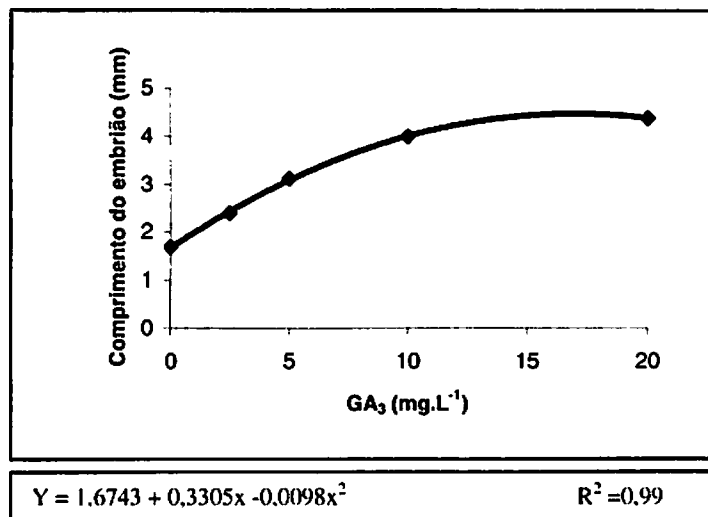


FIGURA 5. Efeito de concentrações de GA₃ no comprimento de embriões s somáticos da *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

4.2 Desenvolvimento de embriões somáticos

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que a interação entre os fatores foi significativa, a 1% de probabilidade, para todas as variáveis.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e massa fresca da parte aérea (MFPA) de plântula de *C. arabica* cv. Acaiaí Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	Quadrados médios			
	GL	NF	CPA	MFPA
Sacarose	4	2,434**	1,001**	0,047**
BAP	3	2,446**	0,728**	0,205**
Sacarose x BAP	12	0,514**	0,583**	0,175**
Erro	60	0,137	0,198	0,011
C.V. (%)		15,28	26,76	24,63

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Número de folhas

Observa-se que o maior número de folhas (3,8) foi obtido com 5,9mg L⁻¹ de BAP associado a 90g L⁻¹ de sacarose (Figura 6). A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido à elevação do potencial osmótico no meio de cultura. A alta concentração de sacarose afeta a assimilação de nutrientes e o efeito de reguladores de crescimento (Pasqual, 2001b).

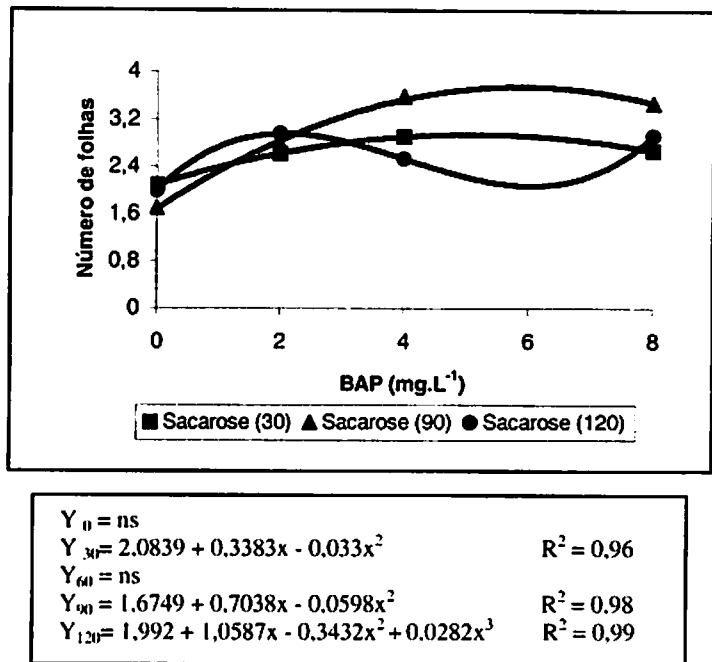


FIGURA 6. Efeito de concentrações de BAP e sacarose no número de folhas de embriões somáticos da *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Resultados contrastantes foram obtidos por Santos et al. (2001), que obtiveram o maior número de folhas (3,6) com a utilização de 9mg L⁻¹ de BAP e 30g L⁻¹ de sacarose na cultura *in vitro* de embriões zigóticos de *C. arabica* cv. Topázio. Isso implica que a utilização de BAP na concentração de 9mg L⁻¹ não incrementou significativamente o número de folhas, quando comparado ao melhor resultado do presente trabalho. Dessa forma, justifica-se a utilização de 5,9mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura, com o objetivo de reduzir os custos do laboratório. Entretanto, deve-se observar que, entre espécies e cultivares ocorrem comportamentos distintos. Possivelmente, a cultivar Topázio requer um

meio de cultura mais rico em sacarose para se desenvolver melhor, quando comparada à cultivar Acaíá Cerrado.

Segundo Sharp et al. (1980), a concentração de sacarose é um fator importante para o cultivo de embriões e, na fase de desenvolvimento, estes necessitam de concentrações elevadas de sacarose (9%-12%).

À medida que aumentaram as concentrações de BAP, até a concentração de $5,9\text{mg L}^{-1}$, combinadas às concentrações de 30 e 90g L^{-1} de sacarose, um incremento no número de folhas foi observado (Figura 6). Porém, Hu & Ferreira (1998) afirmam que os reguladores de crescimento não necessitam ser adicionados ao meio de cultura de embriões, exceto quando o objetivo do trabalho é a multiplicação rápida. Em contrapartida, Maciel et al. (1999), estudando o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, obtiveram os melhores resultados para número de folhas quando adicionaram ao meio de cultura $7,4\text{mg L}^{-1}$ de BAP. Em função do resultado obtido, pode-se constatar a importância da utilização de reguladores de crescimento no meio de cultura para o desenvolvimento de embriões de cafeeiro.

Comprimento da parte aérea

Maior comprimento da parte aérea (2,78cm) foi observado com 2mg L^{-1} de BAP associado a 90g L^{-1} de sacarose, observando-se menores valores quando utilizadas concentrações entre 2,1 e 6mg L^{-1} de BAP (Figura 7), devido, provavelmente, ao desbalanço hormonal, em resposta à elevação das concentrações desse fitoregulador. Esses resultados estão de acordo com Pasqual (2001b), que comenta que altas concentrações de citocininas podem reduzir o comprimento das brotações e estimular a ocorrência de vitrificação. No entanto, concentrações superiores a 6mg L^{-1} de BAP incrementaram o comprimento da parte aérea. Neste caso, justificando essa informação, resultados apresentados por Santos et al. (2001) evidenciaram maior comprimento da parte

aérea com a utilização de 12mg L⁻¹ de BAP na cultura *in vitro* de embriões zigóticos de *C. arabica* cv. Topázio e cv. Acaíá.

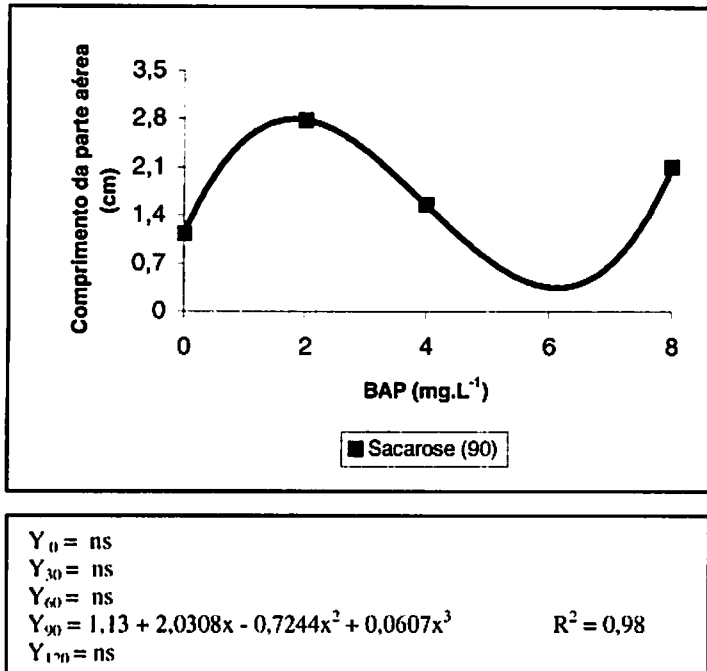


FIGURA 7. Efeito de concentrações de BAP e sacarose no comprimento da parte aérea de embriões somáticos da *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Massa fresca da parte aérea

À medida que aumentaram as concentrações de BAP, na ausência de sacarose, maior massa fresca da parte aérea (1,14g) foi observada (Figura 8).

Utilizando-se 30g L⁻¹ de sacarose podem-se observar menores valores quando foram adicionadas concentrações mais altas do fitorregulador, devido, provavelmente, a uma osmolaridade inadequada do meio de cultura. Segundo Hu & Ferreira (1990), de maneira geral, quanto mais jovem for o embrião, mais alta será a osmolaridade requerida do meio de cultura. Hu & Ferreira (1998)

afirmam ainda que, na maturidade, o embrião pode crescer em meio de cultura desprovido de sacarose.

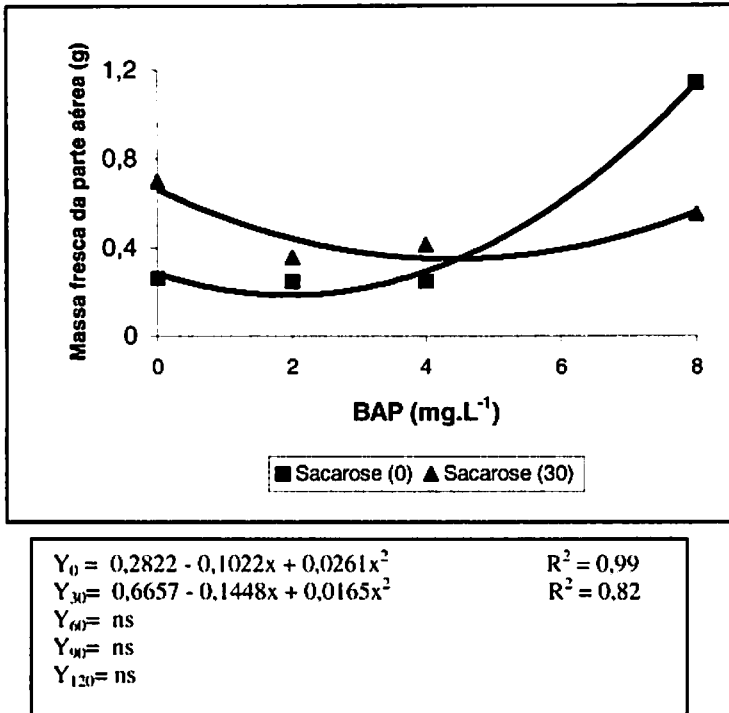


FIGURA 8. Efeito de concentrações de BAP e sacarose na massa fresca da parte aérea de embriões somáticos da *C. arabica* cv. Acaia Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

4.3 Obtenção de plântulas de cafeeiro

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão representados na Tabela 4. Para a variável massa fresca da parte aérea, não houve interação significativa entre os reguladores de crescimento estudados. Observa-se que a interação entre os reguladores de crescimento foi significativa a 1% de probabilidade para as demais variáveis.

TABELA 4. Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e massa fresca da parte aérea (MFPA). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	Quadrados médios			
	GL	NF	CPA	MFPA
GA ₃	4	7,281**	0,451**	0,0003
ANA	3	2,583**	1,144**	0,002**
GA ₃ x ANA	12	5,239**	0,546**	0,0005
Erro	60	1,983	0,125	0,0003
C.V. (%)		26,20	23,57	34,58

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Número de folhas

Maior número de folhas (7,1) foi obtido quando foram utilizados 11,5mg L⁻¹ de GA₃ na ausência de ANA (Figura 9). A partir desse ponto houve uma redução no número de folhas, provavelmente devido ao efeito fitotóxico desse regulador de crescimento. Na concentração de 0,5mg L⁻¹ de ANA na ausência de GA₃, obtiveram-se explantes com 7 folhas. Como não há diferença significativa no número de folhas, justifica-se utilizar 0,5mg L⁻¹ de ANA, que é o regulador de crescimento de menor custo. Na concentração de 0,25mg L⁻¹ de ANA, combinada com 5mg L⁻¹ de GA₃, foram observadas 6 folhas.

Já Andrade et al. (2001), trabalhando com embriões zigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho, observaram melhores resultados para o número de folhas com a utilização de 1mg L⁻¹ de ANA.

Altas concentrações de GA₃, independentemente das concentrações de ANA, proporcionaram folhas alongadas, estreitas e retorcidas (Figura 2A).

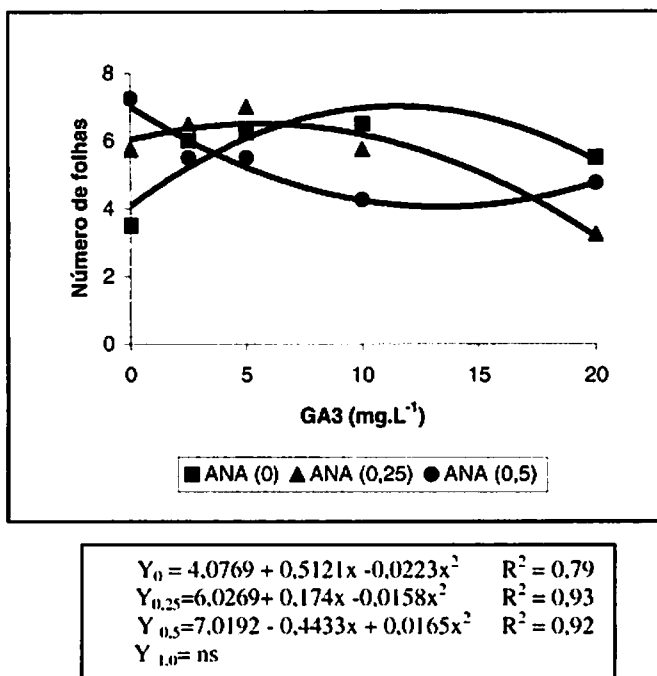


FIGURA 9. Efeito de concentrações de ANA e GA₃ no número de folhas de plântulas de *C. arabica* cv. Acaiaí Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Massa fresca da parte aérea

Para a variável massa fresca da parte aérea de plântulas, verifica-se que não houve interação significativa entre as concentrações de ANA e GA₃ (Tabela 4).

Melhor resultado para massa fresca da parte aérea de embriões (0,079g) foi verificado quando se utilizou 0,75mg L⁻¹ de ANA (Figura 10). Entretanto, na ausência desse mesmo fitorregulador, foram obtidos 0,060g de massa fresca da parte aérea. Nesse caso, justifica-se utilizar o meio de cultura com o fitoregulador ANA ausente, com o objetivo de redução de custos. Já Andrade et al. (2001), estudando embriões zigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuaí

Vermelho, obtiveram melhores resultados para massa fresca com a adição de 0,53mg L⁻¹ de ANA ao meio de cultura.

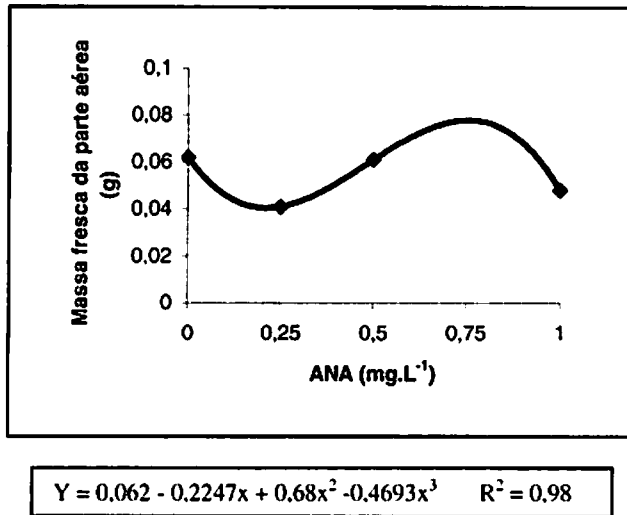


FIGURA 10. Efeito de concentrações de ANA na massa fresca da parte aérea de plântulas de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Comprimento da parte aérea

Melhor resultado para comprimento da parte aérea (2,75cm) foi obtido com a utilização de 0,5mg L⁻¹ de ANA e 14,2mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 11). Entretanto, na ausência de ANA associada a 20mg L⁻¹ de GA₃ obtiveram-se plântulas de cafeeiro com 2,55cm. O incremento das concentrações de GA₃ na ausência de ANA promoveu aumento no comprimento da parte aérea. Entretanto, Andrade et al. (2001) obtiveram melhor resultado para comprimento da parte aérea de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho quando adicionaram, ao meio de cultura, 1mg L⁻¹ de ANA.

Observa-se que, com a concentração de 0,5mg L⁻¹ de ANA, houve um decréscimo no comprimento de plântulas com a adição de concentrações superiores a 14,5mg L⁻¹ de GA₃, provavelmente devido ao efeito fitotóxico desse regulador.

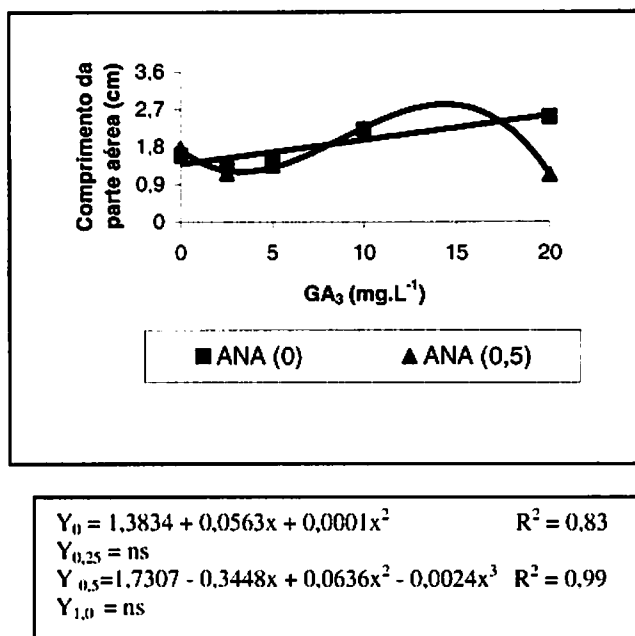


FIGURA 11. Efeito de concentrações de ANA e GA₃ no comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* cv. Acaia Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Há poucos relatos da obtenção de embriogênese somática direta em *C. arabica*. Entretanto, *C. canephora* tem sido utilizada como espécie modelo para o emprego dessa técnica. Esta diferença de resposta entre espécies, aliada à baixa frequência de formação de embriões, indica que alguns problemas ainda precisam ser resolvidos antes do uso prático da micropropagação via embriogênese direta em cafeeiro. Portanto, para a utilização em larga escala, pesquisas ainda são necessárias para desenvolver protocolos de embriogênese

direta que permitam aumentar a amplitude de genótipos capazes de produzir embriões somáticos em alta frequência e estabilidade genética do genótipo do doador.

4.4 Presença ou ausência de raízes na aclimatização de plântulas

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados na Tabela 5. Para a variável massa fresca total houve efeito significativo para os fatores estudados.

TABELA 5. Resumo da análise de variância para as características número de pares de folhas (NPF), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz e massa fresca total de planta (MFT). UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fontes de variação	Quadrados médios				
	GL	NPF	CPA	CMR	MFT
Tratamentos	2	0,9033	0,6440	0,0102	0,0193**
Erro	9	0,3044	0,2401	0,2604	0,0014
C. V. (%)		8,95	10,15	11,05	12,72

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

As variáveis número de pares de folhas, comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz não apresentaram significância para os fatores estudados (Tabela 5) e, dessa forma, para as variáveis em questão, não houve diferença entre os tratamentos. Isso implica que a utilização de AIB, *ex vitro* ou *in vitro*, para o enraizamento de plântulas de cafeeiro, é desnecessária para incrementar o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e raízes. Observou-se que houve 100% de enraizamento em todos os tratamentos testados

(Figura 3A). Esse comportamento está de acordo com Carvalho (1997) que, estudando a aclimatização de cafeeiro cv. Acaia, observou que não havia necessidade do enraizamento *in vitro* com a utilização de AIB.

Segundo George (1996), apesar do interesse para a aclimatização de plântulas enraizadas *in vitro*, tem-se observado que as raízes formadas nesta condição não se tornam suficientemente desenvolvidas para estimular o crescimento de plantas lenhosas. Além disso, o enraizamento *in vitro* é extremamente indesejável sob o aspecto econômico. O gasto extra com o enraizamento *in vitro* apenas se justifica caso este resulte em plântulas de melhor qualidade final ou se perdas durante a aclimatização puderem ser reduzidas.

Massa fresca total

Melhor resultado para massa fresca total (0,341g) foi obtido quando aclimatizaram-se brotações sem raízes (Tabela 6). Provavelmente, devido à regeneração de raízes diretamente no substrato, tende-se a produzir um sistema radicular mais completo e funcional. Segundo Leite (1995), o sistema radicular formado *in vitro* é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares, o que dificulta a absorção de água e nutrientes durante a aclimatização.

O enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, com a utilização de AIB, não contribuiu para maior massa fresca total de plântulas de cafeeiro cv. Acaia Cerrado. Embora o AIB seja a auxina mais utilizada na indução de enraizamento, misturas de diferentes auxinas têm apresentado melhores resultados do que quando utilizadas isoladamente (Assis & Teixeira, 1998). Segundo Carvalho et al. (1999), a imersão de brotações de cafeeiro em solução contendo AIB prejudica o desenvolvimento das plântulas durante a fase de aclimatização.

TABELA 6. Efeito de AIB e presença ou ausência de raízes na massa fresca total de plântulas de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tratamentos	Massa fresca total (g)
SR-MS (sem raiz + MS)	0,341 a
CR-AIB (com raiz + AIB)	0,273 b
SR-AIB (sem raiz + AIB)	0,202 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 CONCLUSÕES

É possível a obtenção de plântulas micropropagadas de *Coffea arabica* L. cultivar Acaiá Cerrado pela embriogênese somática direta.

A ação combinada entre cinetina e GA₃ estimula a indução de embriões somáticos pela via direta.

O enraizamento de brotações de cafeeiro cv. Acaiá Cerrado pode ocorrer simultaneamente ao processo de aclimatização.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, L. M. da C.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; PEREIRA, A. B.; CAVALCANTE-ALVES, J. M. 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.

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

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa/CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

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

BARRUETO CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 2000. 180 p.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

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 transformação de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 87-132.

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

- CARVALHO, G. R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro***. 1997. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T. da. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaiá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 847-851, jun. 1998.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, jul./set. 1999.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 110 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 120, n. 3, p. 435-440, May 1995.
- DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1996.
- DUBLIN, P. Embryogenesis somatique direct sur fragments de feuilles de cafiier Arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 25, n. 4, p. 237-241, oct./dic. 1981.
- 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.
- DUBLIN, P. Multiplication vegetative *in vitro* de l'arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 24, n. 4, p. 281-290, oct./dic. 1980.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes.** 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FUENTES, S. R. L.; CALHEIROS, M. B. P.; MANETTI-FILHO, L.; VIEIRA, L. G. E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *C. canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, n. 1, p. 5-13, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 – The technology. 2. ed. Edington, 1996. 1574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília-DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRAY, D. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 79, n. 5, p. 542-546, May 1992.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília-DF: Embrapa, 1999. v. 2, p. 533-568.

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

HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 10, n. 4, p. 179-182, Dec. 1991.

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

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

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, 1990. p. 71-83.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 371-393.

HU, C. Y.; WANG, O. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (ED.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.

KOCHBA, L.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 38, n. 157, p. 795-802, 1974.

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

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinis on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1998.

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

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; ANDRADE, L. M. C.; PEREIRA, A. B.; CAVALCANTE-ALVES, J. M. Cultura de embriões de *Coffea arabica*: Influência de ANA e BAP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca. **Anais...** Franca: Procafé, 1999. p. 155-156.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C de.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes

foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, jan./fev. 2003.

MENDES, A. N. G. Economia cafeeira: o agrubusiness. In: MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. (Ed.). **Cafeicultura Empresarial – produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. v. 1, p. 1-59.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Economia cafeeira: o agrubusiness**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 59 p.

MICHAUX-FERRIERE, N.; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTEE, Y. (Ed.). **Reproductive biology and plant breeding**, Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 247-259.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

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

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

PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001b. v. 1, p. 71.

PEREIRA, A. R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M. Embriogênese somática de café em diferentes concentrações de BAP e sacarose. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 15., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 19.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

- QI-GUANG, Y.; READ, P. E.; FELLMAN, C. D.; HOSIER, M. A. Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 133-134, Feb. 1986.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 166, p. 15-20, 1977.
- READ, P. E.; FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 166, p. 15-20, 1985.
- RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1986., 1986, Poços de Caldas. **Anais...** Piracicaba: Potafós, 1986. p. 13-85.
- RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; BESPALHOK-FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; GALVÃO, R. M.; VIEIRA, L. G. E. Transformation of *Coffea canephora* P. using particle bombardment. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: FUNAPE/REDBIO, 2001. p. 02-07.
- RIBEIRO, L. S. **Cultura in vitro de embriões e segmentos nodais do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- RIBEIRO, M. T. F.; MEZZOMO, C. P. L.; DUARTE, L. H.; FENELON, A. N. Tradição e moderno se combinam na definição de uma nova trajetória em busca da competitividade: o caso da cadeia alimentar do café no sul de Minas Gerais. In: DESAFIOS E POTENCIALIDADES DA AGRICULTURA NO SUL DE MINAS, 1998, Lavras. **Anais...** Lavras- MG, 1998. p. 1-17.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; PAIVA, P. D. O. Germinação *in vitro* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória: CBPDC, 2001. p. 32.
- SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP-EMBRAPA, 1990. p. 227-249.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* (Biological action of growth substances). **Symposium of the Society Experimental Biology**, Jena, v. 11, p. 116-131, 1957.

SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultura leaf explant of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, Zurik, v. 81, n. 5, p. 395-408, 1977.

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

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

STARITSKY, G.; VAN HASSELT, G. A. The synchronised mass propagation of *Coffea canephora in vitro*. In: **COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ**, 9., 1980, Londres. **Anal...** 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 the American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1988.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, S. L. **Factors affecting rhizogenesis in stem cuttings**. 1981. 222 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnica) – University Riverside – UCR.

VIEIRA, L. G. E.; KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Palestras...** Poços de Caldas-MG, 2000. p. 147-167.

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

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, n. 4, p. 443-462, Apr. 1986.

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

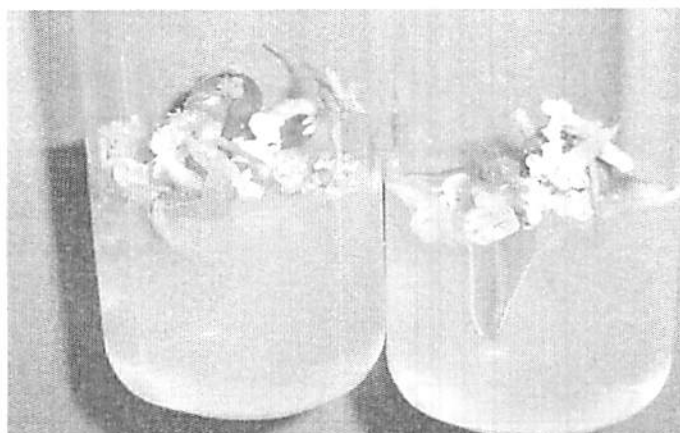


FIGURA 1A. Desenvolvimento de embriões somáticos de cafeeiro cv. Acaia Cerrado pela via direta. UFLA, Lavras, MG, 2004.

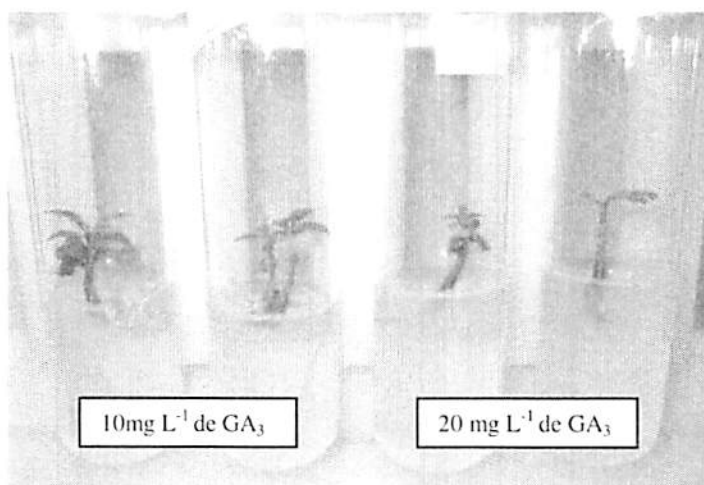


FIGURA 2A. Altas concentrações de GA₃, independentemente das concentrações de ANA, proporcionam folhas alongadas, estreitas e retorcidas. UFLA, Lavras, MG, 2004.

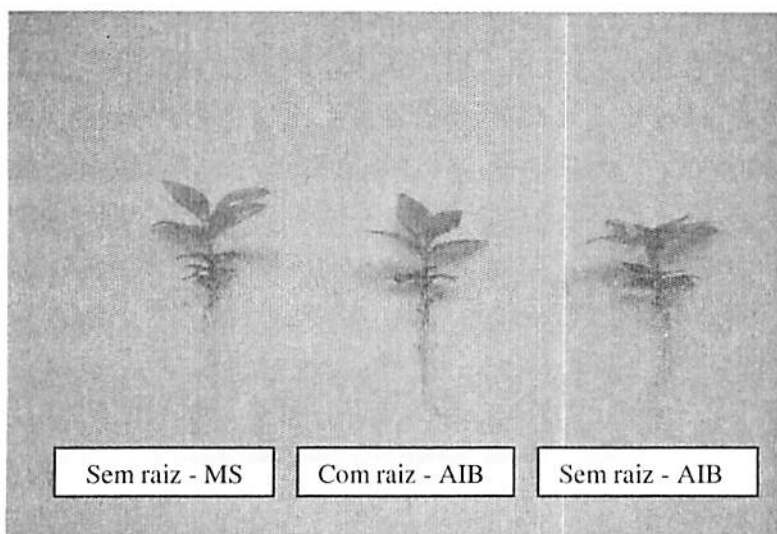


FIGURA 3A. 100% de enraizamento em todos os tratamentos. UFLA, Lavras, MG, 2004.