

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM  
CLONES ELITE DE *Coffea arabica* L.**

**JULIANA COSTA DE REZENDE**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JULIANA COSTA DE REZENDE**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM CLONES ELITE DE  
*Coffea arabica* L.**

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

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

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

Rezende, Juliana Costa de.

Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica*  
L. / Juliana Costa de Rezende. – Lavras : UFLA, 2008.  
91 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Café. 2. Calogênese. 3. Reguladores de crescimento. 4. Embriões  
somáticos. 5. Micropropagação. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD – 633.733

**JULIANA COSTA DE REZENDE**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM CLONES ELITE DE  
*Coffea arabica* L.**

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

APROVADA em 29 de agosto de 2008.

Pesq. Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho	Embrapa
Pesq. Dra. Ester Alice Ferreira	Epamig
Pesq. Dr. João Batista Teixeira	Embrapa
Prof. Dr. Samuel Pereira de Carvalho	UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
UFLA  
(ORIENTADOR)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

A Deus, por iluminar todos os meus caminhos.

**OFEREÇO.**

Aos meus pais, José Maria e Josélia.

A minha irmã, Ana Cristina.

Ao meu namorado, Adriano.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo tudo.

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

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Procafé, por permitir a utilização de sua estrutura para a realização dos ensaios.

Aos orientadores, Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, grande responsável pela realização deste trabalho, por toda atenção, ensinamentos e amizade durante estes anos e ao Prof. Moacir Pasqual, por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Samuel Pereira de Carvalho, Dra. Ester Alice Ferreira e Dr. João Batista Teixeira, pela disponibilidade e sugestões.

A todos os amigos da Fundação Procafé, por todo auxílio, em especial aos pesquisadores Ana Carolina Ramia Santos e Roque Antônio Ferreira, pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, pelo companheirismo durante todos esses anos.

Aos pesquisadores Telde Custódio, Taciana Vilela e Stephan Malfitano, pela colaboração nas análises estatísticas e Clenderson Corradi, pelo auxílio na formatação da tese.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, em especial a Marli dos Santos Túlio e Vantuil Antônio, pela disponibilidade e simpatia sempre constante.

A Epamig, pelo apoio nesta conquista pessoal e profissional e a todos os colegas do CTSM, pela receptividade.

Aos colegas César Elias Botelho, Gladyston Rodrigues Carvalho, Antônio Alves Pereira e Antônio Carlos Baião, pela amizade e experiência transmitida.

Aos amigos do Setor de Cafeicultura, sempre dispostos a ajudar, em especial ao André Dominghetti e ao Alex Mendonça.

Às amigas Cristiane Gris, Cristiane Costa, Alba Regina, Flávia Carvalho, Aparecida Araujo, Ester Ferreira, Marcela e Fernanda Carlota, Fernanda Pereira, Fabíola Villa e Ruth Baganha, tão importantes durante esta etapa. Em especial à amiga inesquecível Mayra Botrel (*in memoriam*), que continua sempre presente em meus pensamentos.

Ao Adriano, meu especial agradecimento pelo companheirismo, apoio e compreensão nas horas difíceis.

Aos meus pais, a Ana Cristina e ao Flávio, pela constante presença, mesmo quando distantes.

As minhas avós, tios e primos, pelo agradável convívio que jamais esquecerei.

A Marise e Ednaldo, pelo carinho, minha gratidão.

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



## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO I. Introdução geral .....	1
2 Introdução.....	2
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 Embriogênese somática.....	3
2.1.1 Embriogênese somática direta.....	4
2.1.2 Embriogênese somática indireta.....	5
2.2 Variação somaclonal.....	8
3 Referências Bibliográficas.....	9
CAPÍTULO II. Indução de calos em explantes foliares de clones elite de <i>Coffea arabica</i> .....	16
1 Resumo .....	17
2 Abstract.....	18
3 Introdução .....	19
4 Material e Métodos .....	20
5 Resultados e Discussão.....	25
6 Conclusões.....	37
7 Referências Bibliográficas.....	37
CAPÍTULO III. Indução e multiplicação de calos embriogênicos de <i>Coffea arabica</i> .....	42
1 Resumo .....	43
2 Abstract.....	44
3 Introdução .....	45
4 Material e Métodos .....	46
5 Resultados e Discussão.....	49
6 Conclusões.....	58
7 Referências Bibliográficas.....	59
CAPÍTULO IV. Influência de auxina e citocinina no desenvolvimento de embriões somáticos de <i>Coffea arabica</i> .....	62
1 Resumo .....	63
2 Abstract.....	64
3 Introdução .....	65
4 Material e Métodos .....	67
5 Resultados e Discussão.....	69
6 Conclusões.....	74

7 Referências Bibliográficas.....	75
8 Anexo.....	78
CAPÍTULO V. Características agrônômicas de cafeeiros propagados via embriogênese somática.....	79
1 Resumo .....	80
2 Abstract.....	81
3 Introdução .....	82
4 Material e Métodos .....	83
5 Resultados e Discussão.....	85
6 Conclusões.....	88
7 Referências Bibliográficas.....	89

## RESUMO

REZENDE, Juliana Costa de. **Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L.** 2008. 91p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Este trabalho foi conduzido visando alcançar alta eficiência na embriogênese somática indireta em explantes foliares de plantas matrizes de *Coffea arabica*. Na indução de embriões somáticos, avaliou-se o potencial de produção de calos embriogênicos de clones elites em diferentes meios de cultura e variações nas concentrações de 2,4-D e 2-iP, nos meios primário e secundário de Teixeira et al. (2004). Na fase de multiplicação de calos, os tratamentos constituíram-se de dois meios de cultura (meio do estágio dois de Albarran et al., 2004 e meio de multiplicação de Teixeira et al., 2004) e dois sistemas de cultivo (gelificado e líquido). As avaliações foram realizadas aos 21, 42 e 63 dias após a instalação do experimento, por meio da pesagem dos calos. Na conversão de embriões somáticos em estágio cotiledonar para plântulas, avaliou-se o efeito do IBA e do BAP no meio de crescimento (PRM) de Teixeira et al. (2004). Plantas produzidas via embriogênese somática foram comparadas, em condições de campo, com plantas provenientes de sementes. Observou-se que a produção de embriões somáticos é fortemente dependente do genótipo. A indução de calos depende da época de coleta dos explantes e da relação de 2-iP e 2,4-D. O sistema gelificado apresentou maior eficiência na multiplicação de calos embriogênicos dos clones estudados. Considerando a porcentagem plântulas normais e plântulas com raízes e os valores médios do comprimento da parte aérea, não há necessidade da adição de IBA e BAP, no protocolo empregado, para a conversão de embriões somáticos em estágio cotiledonar para plântulas. As plantas provenientes de embriogênese somática apresentaram maior diâmetro de copa em relação às plantas provenientes de sementes, não havendo diferença significativa para as demais características avaliadas. Não foi detectada, pela inspeção visual, qualquer alteração no fenótipo na plantas provenientes da embriogênese somática. Assim, o comportamento de plântulas de *Coffea arabica* produzidas via embriogênese somática é semelhante ao de plântulas oriundas de sementes.

---

\* Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-orientador).

## ABSTRACT

REZENDE, Juliana Costa de. **Indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* elite clones**. 2008. 91p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil\*.

This work was carried out with the objective of obtaining high effectiveness in indirect somatic embryogenesis in foliar explants of *Coffea arabica* elite clones. The elite clones embryogenic calli yield potential was evaluated in different media as well as in 2,4-D and 2-iP variations in both primary and secondary media described by Teixeira et al (2004). For the calli multiplication the treatments constituted of two media (stage two medium described by Albarran et al, 2004, and multiplication medium described by Teixeira et al, 2004) and two cultivation systems (solid and liquid). Evaluations were carried out 21, 42 and 63 days after the experiment has been installed, by calli weighing. After the somatic embryos transformation the effect of both IBA and BAP in growth medium (PRM) described by Teixeira et al (2004) was evaluated. Plants produced through somatic embryogenesis were compared, under field conditions, with those originated from seeds. Results show that somatic embryos productions depend on the genotype. Calli induction depends on both the time explants were collected and the 2-iP and 2,4-D relationship. The solid system was more effective in the embryogenic calli multiplication of the clone studied. Taking into account the percentage of both normal and rooted plantlets as well as the aerial part length average values no IBA or BAP addition is needed, in the protocol used, to convert somatic embryos into plantlets. The length of lateral branches of the plants originated from somatic embryogenesis was longer when compared to those originated from seeds. As to the other characteristics evaluated no significant difference was found. No change in the phenotype of plants originated from somatic embryogenesis was noticed by visual inspection. Therefore, the *Coffea arabica* plants originated from somatic embryogenesis were found to behave similarly to those originated from seeds.

---

\*Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-adviser).



## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O café sempre teve grande importância para a economia brasileira, contribuindo de maneira decisiva para a industrialização do país, graças ao capital reunido com as exportações do produto. O país é o maior produtor, com 42,5 milhões de sacas beneficiadas em 2007 (Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, 2008) e o segundo maior consumidor mundial de café, com 17,4 milhões de sacas processadas neste mesmo ano (Anuário Brasileiro do Café, 2007). Além disso, a cafeicultura também proporciona milhões de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia produtiva, exercendo importante papel social no campo.

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

Durante o processo de obtenção de cultivares de cafeeiro utilizando as metodologias convencionais de melhoramento, um ciclo de seleção pode levar até seis anos, considerando que o cafeeiro só começa a produzir cerca de dois anos e meio após o plantio e que são necessárias quatro colheitas para avaliar uma geração. Além disso, para obter dados consistentes, a avaliação de características relacionadas à produtividade somente é realizada em plantas com 6-8 anos de idade (Vieira & Kobayashi, 2000).

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

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

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Embriogênese somática

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

O primeiro a documentar a cultura de tecidos em café foi Staritsky (1970). Este autor utilizou, como explantes, segmentos de internódio de ramos ortotrópicos e obteve calos utilizando o meio de cultura Linsmaier & Skoog (1965) modificado, suplementado com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>), tiamina (1 mg. L<sup>-1</sup>), L-cisteína (10mg. L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100mg. L<sup>-1</sup>), cinetina (0.1mg. L<sup>-1</sup>), ácido 2.4 diclorofenoxiacético (0.1mg. L<sup>-1</sup>) e ácido naftaleno acético (1mg. L<sup>-1</sup>).

Mais tarde, Sharp et al. (1973) estabeleceram calos por meio de sementes, brotos, folhas e anteras de *C. arabica*, utilizado o mesmo meio de cultura de Staritsky (1970), porém, introduzindo ou aumentando a concentração de alguns componentes orgânicos para estabelecer estas culturas. Segundo esses autores, as células dos calos proliferavam mais eficientemente na ausência de iluminação e com temperatura de 28°C.



Monaco et al. (1974), trabalhando com tecidos do perisperma de *C. arabica* e *C. stenophylla*, observaram diferenças na taxa de proliferação celular e textura dos tecidos cultivados, utilizando também o meio de Staritsky (1970), na ausência de 2,4-D.

Subseqüentemente, Söndahl & Sharp (1977) mostraram que a produção de embriões somáticos em explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon segue duas rotas distintas: (1) embriogênese direta ou embriogênese somática de baixa frequência e (2) indireta ou embriogênese de alta frequência. Estes estudos pioneiros foram a base para trabalhos subseqüentes e abriram a possibilidade de utilização dessas técnicas na formulação, no desenvolvimento e na melhoria dos procedimentos para a aplicação da embriogênese somática em outros genótipos de café.

### **2.1.1 Embriogênese somática direta**

A embriogênese direta é a formação de embriões somáticos em explantes sem a fase intermediária de calos (Söndahl & Sharp, 1977; Raghavan & Sharma, 1995). Este processo é obtido em uma única etapa (Dublin, 1981; Yasuda et al., 1985; Hatanaka et al., 1991; Yasuda et al., 1995) e tem a vantagem de produzir embriões somáticos mais rapidamente e com alta taxa de germinação.

Os primeiros trabalhos desenvolvidos na tentativa de eliminar ou diminuir a fase de calo na embriogênese somática de café foram relatados por Staritsky & Hasselt van (1980) que mostraram, como regra geral, que altas concentrações de citocinina estimulam o desenvolvimento de embrióides e que as auxinas favorecem a formação de calos.

Na maioria de plantas, a embriogênese somática direta é de difícil obtenção. Em café, a espécie *C. canephora* tem sido utilizada como modelo na grande maioria dos trabalhos em embriogênese direta, por ser uma espécie relativamente fácil de desencadear a formação de embriões somáticos em meio de cultura somente com citocininas (Ramos et al., 1990; Fuentes et al., 2000). Dublin (1981) mostrou que é possível induzir

embriogênese em explantes foliares de *C. canephora* utilizando apenas o BAP. Esta observação foi confirmada por Yasuda et al. (1985) e Hatanaka et al. (1991) que relataram a importância da citocinina e que auxinas podem ter efeitos inibitórios para embriogênese somática em *C. canephora*.

Entretanto, há poucos relatos da obtenção de embriogênese direta na espécie *C. arabica* (Yasuda et al., 1985; Calheiros, 1993; Rezende, 2005; Pereira et al., 2007). Yasuda et al. (1995) estabeleceram a embriogênese somática em folhas velhas de *C. arabica* e de *C. canephora*, usando a citocinina como único regulador de crescimento.

### **2.1.2 Embriogênese somática indireta**

Na embriogênese somática indireta, os embriões somáticos se formam a partir de calos, que apresentam células em diferentes estágios de diferenciação. Esse procedimento permite produção em larga escala de embriões somáticos mediante a cultura de explantes em dois meios sucessivos: “meio de condicionamento” e “meio de indução” de calos embriogênicos friáveis (Söndahl & Sharp, 1977), com diferentes combinações de auxinas e citocininas (Dublin, 1984; Neuenschwander & Baumann, 1992).

De acordo com Söndahl & Sharp (1977), o sucesso da indução de calos embriogênicos está na alta concentração de 2,4-D e de cinetina no primeiro meio (meio de condicionamento). No meio de indução, a razão auxina/citocinina é reduzida (Berthouly & Michaux Ferriere, 1996; Noriega & Söndahl, 1993; Boxtel & Berthouly, 1996) ou substituída por apenas citocinina (Dublin, 1981; Zamarripa et al., 1991a).

A natureza específica dos calos de alta frequência permite seu uso em cultivos líquidos. A produção de embriões somáticos no meio líquido tem sido utilizada para acelerar a propagação maciça de plantas de café (Staritsky & Hasselt, 1980; de Pena, 1983; Baumann & Neuenschwander, 1990; Zamarripa et al., 1991a; Ducos et al., 1993; Noriega & Söndahl, 1993; Boxtel & Berthouly, 1996; de Faria et al., 2003; Santana et al., 2004; Ducos

et al., 2007). Neuenschwander & Baumann (1992) descreveram um protocolo para a embriogênese somática em cultivo líquido e obtiveram uma taxa de 94,5% embriões germinados, sem passar pela etapa de maturação.

Zamarripa et al. (1991b), Noriega & Söndahl (1993), Berthouly et al. (1995), Boxtel & Berthouly (1996), Etienne et al. (1997), Etienne-Barry et al. (1999), Afreen et al. (2002), Albarran et al., (2004) e Ducos et al. (2007) obtiveram produção maciça de embriões somáticos utilizando biorreator de imersão temporária. Este sistema permite a regeneração direta no recipiente e sem subcultivo das células suspensas. Em todos os trabalhos foram obtidas altas frequências de tecidos embriogênicos e regeneração de plantas.

Ducos et al. (1993), utilizando biorreator sob agitação, obtiveram  $200-500 \times 10^3$  embriões somáticos de café.L<sup>-1</sup> de meio e Zamarripa (1993) descreveu a embriogênese somática em *C. canephora* e Arabusta, relatando rendimentos de  $400-500 \times 10^3$  embriões, após sete semanas. Ducos et al. (1999) mediram a capacidade de regeneração de plantas e afirmaram que 56.000 plântulas poderiam ser regeneradas ao partir de 1 g de calos.L<sup>-1</sup> de meio.

Zamarripa et al. (1991b) relataram que produção de embriões somáticos em meio líquido é altamente dependente da densidade do inóculo. Segundo esses autores, a produção e o desenvolvimento dos embriões são inibidos quando a densidade do inóculo é elevada, porém, esta inibição é reduzida quando o meio é periodicamente renovado.

Recentemente, a regeneração de embriões somáticos de *C. arabica* foi melhorada otimizando-se os ciclos da imersão do biorreator imersão temporária. Albarran et al. (2004) demonstraram que, aumentando a frequência de imersões curtas (1 minuto de imersão para cada 24, 12 e 4 horas) a produção de embriões foi estimulada (480, 2.094 e 3.081 embriões.L<sup>-1</sup>, respectivamente) e a qualidade melhorada (60%, 79% e 85% de embriões torpedo, respectivamente)

A embriogênese somática no café foi o assunto de diversos estudos histológicos (Söndahl et al., 1979a, b; Nassuth et al., 1980; Michaux-Ferrière

et al., 1987, 1989; Nakamura et al., 1992; Tahara et al., 1995; Menéndez-Yuffá & de García, 1997; Quiroz-Figueroa et al., 2002). Söndahl et al. (1979a) descreveram estudos histológicos da embriogênese somática indireta de *C. arabica* e demonstraram que a proliferação de calos, dos quais embriões se diferenciam e formam células, originam-se de células do mesófilo esponjoso. Nassuth et al. (1980) observaram que todos os tecidos parenquimáticos entre a epiderme e o câmbio vascular são capazes de se diferenciar em tecido calogênico, sendo o córtex a camada a mais ativa nesse sentido.

Michaux-Ferrière et al. (1989) e Menéndez-Yuffá & de García (1997) forneceram evidências para a hipótese de que embriões somáticos em *Coffea* tinham origem unicelular. Quiroz-Figueroa et al. (2002) concluíram, com base em suas observações histológicas, que ambos os embriões somáticos diretos e indiretos do café, formados sobre explantes de folhas e calos, respectivamente, tinham origem unicelular.

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

Segundo Cordeiro (1999), a embriogênese somática em *Coffea* apresenta tipos distintos de calos durante a fase de indução. Os calos primários nodulares referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos freqüentemente, na totalidade dos bordos dos explantes. Os calos primários mistos, além da formação globular, apresentam formações amorfas de células alongadas com aspecto de algodão e se caracterizam pelo crescimento visivelmente mais rápido. Os calos embriogênicos de baixa freqüência são calos primários que apresentam até

20 embriões/explante e, quando estes apresentam agregados celulares granulados, facilmente destacáveis e de cor amarelo-creme, são, então, caracterizados como calos embriogênicos de alta frequência, ou calos embriogênicos friáveis.

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., 1998).

## **2.2 Variação somaclonal**

De 1996 a 2000, um experimento em larga escala com plantas de robusta foi conduzido em cinco países produtores de café: Filipinas, Tailândia, México, Nigéria e Brasil, utilizando cerca de 12.000 plântulas somáticas de 10 clones. Ducos et al. (2003) e Ducos & Petiard (2003) compararam, nas Filipinas e na Tailândia, plantas produzidas por microestaquia e plantas originadas de células embriogênicas em suspensão. Não foi observada nenhuma diferença significativa quanto às características morfológicas, às variações somaclonais e à produção de frutos.

No caso do café arábica, variações somaclonais puderam ser observadas. Com base no processo de embriogênese somática de um grande número de variedades, Söndahl & Lauritis (1992) estimaram em 10% a variabilidade em plantas micropropagadas. A frequência de variação somaclonal foi genótipo-dependente, variando de 3% a 30%, dependendo da variedade (Söndahl & Baumann, 2001). Esse resultado foi confirmado por Etienne & Bertrand (2001) que encontraram variação de 3% a 10% em 30.000 plantas obtidas de 20 clones de híbridos de *C. arabica*. A porcentagem de variação aumentou drasticamente quando a suspensão embriogênica foi subcultivada por mais de seis meses (Etienne & Bertrand, 2003). Entre plantas produzidas depois de 3 meses de multiplicação de calos em meio líquido, a frequência de variação foi somente de 1,3% e, após 12 meses, essa porcentagem aumentou para 25%

Estes estudos mostraram que o método de propagação estudado pode ser usado para plantio comercial em larga escala de *C. canephora*, sem qualquer consequência negativa para o consumidor. Entretanto, no caso do *C. arabica*, é importante estudar os parâmetros de variação específicos para cada protocolo de micropropagação, pois pequenas mudanças metodológicas podem causar efeitos dramáticos na qualidade do produto final.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic Culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large escale plantlet conversion form cotyledonary embryos. **Annals of Botany**, v. 90, p. 21-29, 2002.

ALBARRAN, J.; BERTRAND, B.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.27-36, 2004.

ANUARIO BRASILEIRO DO CAFÉ. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2007. 136p.

BAUMANN, T.W.; NEUENSCHWANDER, B. Tissue culture in coffee biotechnology. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.34, p.158-164, 1990.

BERTHOULY, M.; DUFOUR, M.; ALVARD, D.; CARASCO, C.; ALEMANN, L.; TEISSON, C. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1995. p.514-519.

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

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

CALHEIROS, M.B.P. **Efeito da aplicação de poliaminas da embriogênese somática de café (*Coffea* sp).** 1993. 80p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira Café:** primeira estimativa. Brasília: CONAB, 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 08 jan. 2008.

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

DE FERIA, M.; JIMENEZ, E.; BARBON, R.; CAPOTE, A.; CHAVEZ, M.; QUIALA E. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.1-16, 2003.

DE PENA, M. Somatic embryos induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *C. arabica*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEIRO, 1983, Oeiras. **Proceedings...** Oeiras, Portugal: CIFC, 1983. p.493-512.

DUBLIN, P. Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café, Cacao, Thé**, v.25, p.237-242, 1981.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative in vitro et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, v.28, p.231-244, 1984.

DUCOS, J.P.; ALENTON, R.; J.F. REANO.; KANCHANOMAI, C.; DESHAYES, A.; PETIARD, V. Agronomic performance of *Coffea canephora* P. tress derived form large-scale somatic embryo production in liquid medium. **Euphytica**, v.131, p.215-223, 2003.

DUCOS, J.P.; GIANFORCARO, M.; FLORIN, B.; PÉTIARD, V.; DESHAYES, A. A technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: in vitro somatic embryogenesis. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings ...** Paris: ASIC, 1999. p.295-301.

DUCOS, J.P.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Bioreactors for coffee propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of plant developmental biology**, n.1, v.1, p.1-12, 2007.

DUCOS, J.P.; PETIARD, V. Propagation de clones de Robusta (*C. canephora* P.) par embryogenèse somatique em milieu liquide. In: EL HADRAMI I.; DAAY, F. (Ed.). **Biotechnologies vegetales: de la structure des genomes a l'amélioration des plantes**. Marrakech, Marocco: El Watanya, 2003. p.142-159.

DUCOS, J.P.; ZAMARRIPA, A.; ESKES, A.; PÉTIARD, V. Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Montpellier. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1993. p.89-96.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiology**, v.21, p.1031-1038, 2001.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. **Tree Physiology**, v.23, p.419-426, 2003.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; CÔTE, F.; BERTHOULY, M. L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17., 1997, Montreux. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1997. p.457-465.

ETIENNE-BARRY, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct snowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.111-117, 1999.

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**, n.60, p.5-13, 2000.

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

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



- LINSMAIER, M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.18, p.100-127, 1965.
- MENÉNDEZ-YUFFÁ, A.; de GARCÍA, E.G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma**, v.199, p.208-214, 1997.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; BIEYSSE, D.; ALVARD, D.; DUBLIN, P. Étude histologique de l’embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café, Cacao, Thé**, v.33, p.207-217, 1989.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DUBLIN, P.; SCHWENDIMAN, J. Étude histologique de l’embryogenèse somatique à partir d’explants foliaires de *Coffea arabica* L. **Café, Cacao, Thé**, v.31, p.103-111, 1987.
- MONACO, L.C.; MEDINA, H.; SÖNDAHL, M.R. Perisperm culture of coffee. **Ciência e Cultura**, v.26, p.240, 1974.
- NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Japanese Journal of Crop Science**, v.61, p.476-486, 1992.
- NASSUTH, A.; WORMER, T.M.; BOUMAN, F.; STARITSKY, G. The histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. **Acta Botanica Neerlandica**, v.29, p.49-54, 1980.
- NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.608-612, 1992.
- NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ASIC, 1993. p.73-81.
- PEREIRA, A.R.; CARVALHO, S.; PEREIRA de; PASQUAL M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e agrotecnologia**, v.31, n.2, p.332-336, 2007.
- QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic

embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.

RAGHAVAN, V.; SHARMA, K.K. Zygotic embryogenesis in gymnosperms and angiosperms. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. The Netherlands: Kluwer Academic, 1995. p.73-115.

RAMOS, L.C.S.; YOKOO, E.Y.; GONÇALVES, W.; FAZUOLI, L.C. Embriogênese somática direta em café. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1990. p.64-65.

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

SANTANA, N.; GONZALES, M.E.; VALCARCEL, M.; CANTO-FLICK, A.; HERNANDEZ, M.; FUENTES CERDA, C.F.J.; BARAHONA, F.; MIJANGOS-CORTES J.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. **In vitro Cellular and Development Biology– Plant**, v.40, p.95-101, 2004.

SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CROCOMO, O.J.; MONACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, v.31, p.67-74, 1973.

SÖNDAHL, M.R.; BAUMANN, T.W. Agronomy II: developmental and cell biology. In: CLARKE, R.J.; WITZTHUN, O.J. (Ed.). **Coffee: recent developments**. Oxford, UK: Black- Well Science, 2001. p.202-220.

SÖNDAHL, M.R.; LAURITIS, J.A. Coffee. In: POR, F.A.; HAMMERSCHLAG, F.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. London: CAB International, 1992. p.401-420.

SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* **Zeitschrift fuer Pflanzen Physiologie**, v.81, p.395-408, 1977.

SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. In: SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F.; RAGHAVAN, V. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Columbus: Ohio State University, 1979. p.527-584.

SÖNDAHL, M.R.; SPAHLINGER, D.A.; SHARP, W.R. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fuer Pflanzen Physiologie**, v.94, p.101-108, 1979a.

SÖNDAHL, M.R.; SALISBURY, J.L.; SHARP, W.R. Characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. **Zeitschrift fuer pflanzen physiologie**, v.94, p.185-188, 1979b.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, v.19, p.509-514, 1970.

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

TAHARA, M.; NAKANISHI, T.; YASUDA, T.; YAMAGUCHI, T. Histological and biological aspects in somatic embryogenesis of *Coffea arabica*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL COFFEE, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Kyoto, 1995. p.860-867.

TISSERAT, B.; ESAN, B.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Review**, v.1, p.1-78, 1979.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p.101-103.

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

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

YASUDA, T.; TAHARA, M.; HATANAKA, T.; NISHIBATA, T.; YAMAGUCHI, T. Clonal propagation through somatic embryogenesis of *Coffea* species. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1995. p.392-402.

ZAMARRIPA A. **Étude et development de l'embryogenèse en milieu liquid du caféier (*Coffea canephora* P.; *Coffea arabica* L. et l'hybrid**

**Arabusta**). 1993. Thèse (Doctorat) - École National Supérieure  
Agronomique, Rennes, France.

ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; TESSERAU, H.; BOLLON, H.; ESKES,  
A.; PÉTIARD, V. Développement d' un procédé de multiplication en masse  
du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide. In: COLLOQUE  
SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San  
Francisco. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1991a. p.392-402.

ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.;  
PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu  
liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café,  
Cacao, Thé**, v.35, n.4, p.233-244, 1991b.

## **CAPÍTULO II**

### **INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE GENÓTIPOS ELITE DE *Coffea arabica***

## 1 RESUMO

REZENDE, Juliana Costa de. Indução de calos em explantes foliares de genótipos elite de *Coffea arabica*. In: \_\_\_\_\_. **Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L.** 2008. Cap. 2, p.16-41. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

Visando alcançar alta eficiência na indução de calos a partir de explantes foliares de plantas matrizes de *Coffea arabica* com alta heterozigose, por meio da embriogênese somática indireta, foram instalados três experimentos. O primeiro experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras, em esquema fatorial 2 x 5, constituído de dois meios de cultura (Boxtel & Berthouly, 1996 e Teixeira et al., 2004) e cinco genótipos de *Coffea arabica*. No segundo experimento, foi avaliado o potencial de produção de calos embriogênicos em 10 genótipos, sendo cada genótipo considerado como um tratamento e no terceiro experimento, foram avaliadas as variações nas concentrações de 2,4-D e 2-iP nos meios primário e secundário de Teixeira et al. (2004). Estes experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha. O terceiro experimento foi conduzido duas vezes, nas mesmas condições, para melhor verificação dos resultados, variando-se a época de instalação. O experimento 3a foi inoculado em 17/12/2007 e o experimento 3b, em 07/03/2008. As culturas foram mantidas a 25±2°C, sob obscuridade. Para os genótipos 2.2 e 7.2, verificou-se a superioridade do meio de cultura Teixeira et al. (2004) em relação ao meio Boxtel & Berthouly (1996). No genótipo 4.2, observou-se o comportamento inverso, ou seja, a superioridade do meio Boxtel & Berthouly (1996). Os genótipos 3.0 e 5.0 apresentaram o mesmo comportamento em ambos os meios de cultura estudados, evidenciando que a produção de embriões somáticos é fortemente dependente do genótipo. A indução de calos depende da época de coleta dos explantes e da relação de 2-iP e 2,4-D.

---

\* Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-orientador).

## 2 ABSTRACT

REZENDE, Juliana Costa de. Induction of callus in elite clones of *Coffea arabica* leaf explants. In: \_\_\_\_\_. **Indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* elite clones.** 2008. Chap. 2, p. 16-41. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

Three experiments were carried out with the objective of achieving high effectiveness in calli induction from *Coffea arabica* high heterozygosity leaf explants through indirect somatic embryogenesis. The first experiment was conducted at the Tissue Culture Laboratory of the Federal University of Lavras. A 2 x 5 factorial design made up of two media [Boxtel & Berthouly (1996) and Teixeira et al. (2004)] and five *Coffea arabica* genotypes was used. In the second experiment the embryogenic calli production potential was evaluated in ten genotypes. Each of them was considered as a treatment. In the third experiment the variations in both 2,4-D and 2-iP levels concentrations in Teixeira et al. (2004) PM and SM media were evaluated. The second and the third experiment were conducted at the Fundação Procafé Tissue Culture Laboratory in Varginha, MG. In order to improve the results assessment effectiveness the latter experiment was double conducted each at a different date, as follows: the first one (3a) on December 17<sup>th</sup> 2007 and the second one (3b) on March 7<sup>th</sup>, 2008. Crops were maintained in a growth room under darkness  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . The medium described by Teixeira et al (2004) was found to be superior when compared to that described by Boxtel & Berthouly (1996) in the 2.2 and 7.2 genotypes. However, an opposite behavior of those media was noticed in the 4.2 genotype. Both the 3.0 and the 5.0 genotypes had the same behavior in both media studied what shows that the somatic embryos production is extremely dependent on the genotype. Calli induction depends on both the explants time collection and the 2-iP and 2,4,D relationship.

---

\*Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

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

Segundo Merkle et al. (1995), a indução de embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e pela qualidade do explante (Byesse et al., 1993; Loyola-Vargas et al. 1999).

As auxinas e as citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. Com o objetivo de obter tecido embriogênico em *Coffea*, duas estratégias têm sido utilizadas: a primeira envolve o cultivo de explante sobre um único meio de cultura, suplementado apenas com citocinina (Dublin, 1981; Yasuda et al., 1985; Hatanaka et al.; 1991) ou a combinação de auxina e citocinina (Pierson et al., 1983). A segunda estratégia utiliza o cultivo de explantes em um meio primário ou de indução, seguido da transferência dos explantes para o meio secundário, que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (Noriega & Söndahl, 1993; Boxtel & Berthouly, 1996; Barry-Etienne et al., 2002; Teixeira et al., 2004).

Todavia, a fonte, as doses e a relação auxina/citocinina variam grandemente entre os protocolos. Söndahl & Sharp (1977), estudando várias concentrações de reguladores de crescimento em meio de indução e



condicionamento, obtiveram a melhor taxa de proliferação de calos na presença de cinetina (9,2 $\mu$ M), 2,4-D (4,5 $\mu$ M) e ANA (21,6 a 43,2 $\mu$ M). Em trabalhos realizados recentemente por Boxtel & Berthouly (1996), são utilizados 2,4-D (2,26 $\mu$ M em meio C e 4,52 $\mu$ M em meio E), 2-iP (9,84  $\mu$ M) e IBA (4,92 $\mu$ M). Teixeira et al. (2004) utilizam esses mesmos reguladores, porém, em concentrações diferentes de 2,4-D (20,0 $\mu$ M em meio PM e 10,0 $\mu$ M em meio SM).

A disponibilidade de um eficiente processo de embriogênese somática poderia aumentar a rápida produção em massa de materiais heterozigotos, tais como híbridos de *Coffea arabica*. Diante dos fatos, este estudo foi realizado com o objetivo de buscar alta eficiência para a indução de calos a partir de explantes foliares de plantas matrizes de *Coffea arabica*, por meio de embriogênese somática indireta. Sendo assim, no primeiro experimento, foram comparados dois protocolos de indução de calos embriogênicos em cinco genótipos de *Coffea arabica* de alta heterozigose. No segundo, foi avaliado o potencial de formação de calos embriogênicos de 10 genótipos provenientes de plantas matrizes com resistência à ferrugem e ao bicho-mineiro e, no terceiro, foram avaliadas variações nas concentrações de 2,4-D e 2-iP nos meios primário e secundário de Teixeira et al. (2004).

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Folhas bem desenvolvidas, correspondentes ao terceiro par, foram coletadas dos ramos plagiotrópicos do terço médio de plantas matrizes adultas e conduzidas aos laboratórios de cultura de tecidos, onde foram realizados os experimentos. Foi feita aplicação dos fungicidas Triazol+Estrobilurina, nome comercial Sphere<sup>®</sup>, nas plantas matrizes, 24 horas antes da coleta dos explantes.

Para assepsia, as folhas foram imersas em solução de álcool 70%, por um minuto e desinfestadas com hipoclorito de sódio, na concentração de

2,4%, durante 15 minutos. Em seguida, as folhas foram lavadas por três vezes com água destilada autoclavada.

Após o preparo dos meios, estes tiveram o pH ajustado para  $5,6 \pm 0,1$ , utilizando-se NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, antes do processo de autoclavagem, realizado a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm, por 20 minutos. Com auxílio de bisturi, as folhas foram cortadas em quadrados de, aproximadamente,  $1\text{cm}^2$  e os explantes inoculados com a face adaxial da folha em contato com os meios de cultura.

### **Experimento 1- Influência de meios de cultura e genótipos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados como explantes folhas de genótipos em geração  $F_1$  de *Coffea arabica* (Tabela 1), mantidos em casa de vegetação, provenientes do Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro conduzido pela UFLA/Epamig/UFV.

TABELA 1 Genótipos de *Coffea arabica* utilizados no Experimento 1, provenientes do Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro conduzido pela Epamig/UFLA/UFV.

Genótipos	Genitores
2.2	Icatu 2942 x Catuaí 5002
3.0	Icatu 4040-179 x Catuaí 62
5.0	Icatu 2942 x Catuaí 62
4.2	Icatu 4040-179 x Catuaí 17
7.2	Icatu 2942 x Catuaí 99

Os explantes foliares passaram por duas etapas. Na primeira, foram inoculados em meio primário, PM ou meio C (Tabela 2) e, após um período de 30 dias em sala de crescimento na ausência de luz e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , foram transferidos para o meio secundário, SM ou meio E, respectivamente, no qual permaneceram por 150 dias, nas mesmas condições anteriores.

TABELA 2 Composição dos meios de cultura utilizados no experimento 1 de acordo com Boxtel & Berthouly (1996) (meio C e meio E) e Teixeira et al. (2004) (meio PM e meio SM).

Compostos	Concentração final (mg.L <sup>-1</sup> )			
	Meio C*	Meio E*	Meio PM**	Meio SM**
Macronutrientes	MS <sup>***</sup> /2	MS/2	MS/2	MS/2
Micronutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2
FeSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	13,9	13,9	13,9	13,9
Na <sub>2</sub> .EDTA.	18,65	18,65	18,65	18,65
Tiamina	10	20	10	10
Piridoxina	1	-	1	1
Ácido nicotínico	1	-	1	1
Glicina	1	20	1	1
L-cisteína	-	40	-	-
Mio-inositol	100	200	100	100
Sulfato adenina	-	60	-	-
Caseína	100	200	100	100
Extrato de malte	400	800	400	400
2,4-D (µM)	2,26	4,52	20,0	10,0
IBA(µM)	4,92	-	4,92	4,92
2-iP(µM)	9,84	-	9,84	9,84
BAP (µM)	-	17,77	-	-
Sacarose	30.000	30.000	20.000	20.000
Phytigel	2.000	2.000	2.400	2.400
pH	5.6	5.6	5.8	5.8

\* Boxtel & Berthouly (1996) \*\* Teixeira et al. (2004) \*\*\* Murashige & Skoog (1962)

Foram utilizados tubos de ensaio de 16x160mm, contendo cerca de 15mL de meio. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 repetições (seis explantes considerados como parcela) e esquema fatorial 2 x 5, constituído de dois meios de cultura (Boxtel &

Berthouly, 1996 e Teixeira et al., 2004) e cinco genótipos de *Coffea arabica* (Tabela 1). Aos 180 dias após a instalação, foi avaliada a formação de calos embriogênicos. Para a avaliação da presença de calos, foram considerados como covariáveis os genótipos com cinco categorias e os meios, duas categorias.

Foram testados os ajustes para quatro modelos: o primeiro com nenhum fator (nulo); o segundo considerando o efeito principal meio de cultura; o terceiro incorporando o efeito principal de genótipos e o último, a interação. Para selecionar o modelo mais adequado, utilizou-se a análise de Deviance e, após análise de resíduos, observou-se que os melhores ajustes foram obtidos com a família quasibinomial e a função de ligação probit. Foi verificada a homogeneidade da variância e, sendo ela satisfatória, empregou-se o teste de comparação de médias Scott & Knott. As análises foram realizadas empregando-se a rotina GLM (*Generalized Linear Model*)\* pelo fato de os dados de porcentagem não seguirem uma distribuição normal.

Os experimentos 2 e 3 foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, MG. Foi avaliado o potencial de produção de calos embriogênicos em genótipos de *Coffea arabica* com resistência à ferrugem e ao bicho-mineiro, provenientes da população Siriema (*Coffea racemosa* x *Coffea arabica*).

De acordo com o protocolo descrito por Teixeira et al. (2004) (Tabela 2), os explantes foliares foram inicialmente inoculados em meio primário (PM) e, após um período de 30 dias em sala de crescimento, na ausência de luz e temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , foram transferidos para o meio secundário (SM), permanecendo nas mesmas condições relatadas.

## **Experimento 2- Potencial de formação de calos**

---

\*Aplicativo computacional R® (R, 2008).

Foram estudados 10 genótipos provenientes de progênies em geração F<sub>3</sub>, descritos a seguir: 4-20, 20-5, 10-1, 5-14, 6-38, 14-8, 14-3, 8-10, 02 e 10-8, sendo cada genótipo considerado como um tratamento. Esses genótipos foram selecionados para serem utilizados como plantas matrizes visando à produção de mudas clonais.

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições, correspondentes a cada placa de Petri, contendo nove explantes. A avaliação do experimento foi efetivada seis meses após a instalação, constituindo da porcentagem de explantes com calos embriogênicos. Foram testados os ajustes para dois modelos: o primeiro com nenhum fator (nulo) e o segundo considerando o efeito principal do genótipo. Utilizou-se a análise da Deviance e, após análise de resíduos, observou-se que os melhores ajustes foram obtidos com a família quasibinomial e a função de ligação probit. Foi verificada a homogeneidade da variância e, sendo ela satisfatória, empregou-se o teste de comparação de médias Scott & Knott. As análises foram realizadas empregando-se a rotina GLM (*Generalized Linear Models*)\*.

### **Experimento 3a e 3b- Influência dos níveis de 2-iP e 2,4-D**

Este experimento foi conduzido duas vezes, nas mesmas condições, para a melhor verificação dos resultados, variando-se a época de instalação. O experimento 3a foi inoculado em 17/12/2007 e o experimento 3b, em 07/03/2008.

Os tratamentos constituíram-se de variações nas concentrações de 2,4-D e 2-iP nos meios PM e SM de Teixeira et al. (2004) (Tabela 2), descritas a seguir: 2,5µM de 2,4-D e 2,5µM de 2-iP (tratamento 1), 2,5µM de 2,4-D e 20,0µM de 2-iP (tratamento 2), 20,0µM de 2,4-D e 2,5µM de 2-iP (tratamento 3), 20,0µM de 2,4-D e 20,0µM de 2-iP (tratamento 4), 20,0 µM de 2,4-D e 9,84µM de 2-iP no meio PM e 10,0µM de 2,4-D e 9,84µM

---

\* Aplicativo computacional R<sup>®</sup> (R, 2008)

de 2-iP no meio SM (tratamento 5, meio de Teixeira et al. (2004), utilizado como testemunha).

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições, sendo cada parcela constituída de uma placa de Petri com nove explantes. Foram utilizadas como explantes folhas do genótipo 03. As avaliações foram feitas cinco meses após a instalação dos experimentos, por meio da porcentagem de explantes com calos embriogênicos.

Foram testados os ajustes para dois modelos: o primeiro com nenhum fator (nulo) e o segundo, considerando o efeito dos cinco tratamentos estudados. Utilizou-se a análise da Deviance e, após análise de resíduos, observou-se que os melhores ajustes foram obtidos com a família quasibinomial e a função de ligação probit, para os dados de ambos os experimentos. Foi verificada a homogeneidade da variância e, sendo ela satisfatória, empregou-se o teste de comparação de médias Scott & Knott. As análises foram realizadas empregando-se a rotina GLM (*Generalized Linear Models*).<sup>\*</sup>

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1- Influência de meios de cultura e genótipos

Na Tabela 3 é apresentada a análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares, mantidos em meio de indução de calos, provenientes de folhas coletadas de cinco genótipos com alta heterozigose.

---

\* Aplicativo computacional R<sup>®</sup> (R, 2008)

TABELA 3 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos nos tratamentos estudados. UFLA, Lavras, MG, 2007

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo		64,942		59	
(2) $X_1$	1	64,860	0,082	58	0,731
(3) $X_2$	4	48,438	16,422	54	$9,695e^{-5}$ *
(4) $X_1 * X_2$	4	36,369	12,069	50	0,002*

\*Significativo, pelo teste do qui-quadrado, a 5% de significância.  $X_1$  = meios de cultura estudados  $X_2$  genótipos.

Pelo resultado do teste do qui-quadrado de Pearson, o modelo que considerou os meios de cultura ( $X_1$ ) não foi significativo, havendo evidências da necessidade de elaboração de um modelo mais simples que não o levasse em consideração. Dessa forma, foi realizada uma nova análise utilizando apenas o modelo (3) e o modelo (4). Observa-se, pelos dados da Tabela 4, que o genótipo influencia a formação de calos embriogênicos, pelo teste do qui-quadrado a 5% de significância.

TABELA 4 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos nos tratamentos estudados, desconsiderando o efeito principal meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo		64,942		59	
(2) X <sub>2</sub>	4	48,631	16,311	55	0,000104*
(3) X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	5	36,369	12,262	50	0,003*

\*Significativo, pelo teste do qui-quadrado, a 5% de significância. X<sub>1</sub> = meios de cultura estudados X<sub>2</sub> genótipo.

Verifica-se, pelos dados da Tabela 5, o comportamento diferenciado apenas dos genótipos inoculados em meio de cultura Boxtel & Berthouly (1996) (X<sub>1</sub>), evidenciado pelo efeito significativo do teste do qui-quadrado a 5% significância. Por outro lado, os genótipos inoculados em meio Teixeira et al. (2004) (X<sub>2</sub>) não apresentaram significância, demonstrando que este meio de cultura não influencia o comportamento dos mesmos.

TABELA 5 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos nos tratamentos estudados, considerando os genótipos nos dois meios de cultura estudados. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo		34,079		29	
(2) X <sub>1</sub>	4	13,620	20,459	25	1,148e <sup>-8</sup> *
(3) X <sub>2</sub>	4	22,7495	8,0317	25	0,0668

\*Significativo, pelo teste do qui-quadrado, a 5% de significância. X<sub>1</sub> = genótipos no meio Boxtel & Berthouly (1996); X<sub>2</sub> = genótipos no meio Teixeira et al. (2004).

O genótipo 4.2 apresentou maior formação de calos embriogênicos quando inoculado no meio Boxtel & Berthouly (1996), correspondendo a 19,44% dos calos formados, sendo estatisticamente superior aos demais (Tabela 6). Neste mesmo meio de cultura, não houve formação de calos



embriogênicos nos híbridos 2.2, 5.0 e 7.2. No meio de cultura Teixeira et al. (2004), apenas o híbrido 5.0 não apresentou formação de calos.

TABELA 6 Porcentagem de formação de calos embriogênicos em explantes foliares dos genótipos 2.2; 3.0; 4.2; 5.0 e 7.2, desenvolvidos segundo os meios de cultura estudados. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Meios de cultura	Calos embriogênicos (%) <sup>1</sup>				
	G 2.2	G 3.0	G 4.2	G 5.0	G 7.2
Boxtel & Berthouly	0,0 b B	6,11 b A	19,44 a A	0,0 b A	0,0 b B
Teixeira et al.	2,94 a A	6,11 a A	5,50 a B	0,0 a A	13,89 a A

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de significância.

Essa variabilidade na formação de calos embriogênicos (de 0 a 19,44%, dependendo do genótipo) corrobora o resultado encontrado por Teixeira et al. (2001), os quais afirmam que um dos principais fatores relacionados à embriogênese somática em café diz respeito à influência do genótipo. Söndahl & Bragin (1991) e Byesse et al. (1993) também encontraram grande variabilidade de resposta para produção de embriões somáticos entre oito cultivares de *Coffea arabica* e Molina et al. (2002) relataram diferenças de resposta entre plantas do mesmo genótipo, porém, de gerações diferentes.

No primeiro trabalho sobre embriogênese somática de *Coffea arabica*, Söndahl & Sharp (1977) obtiveram taxas relativamente elevadas, chegando a 60% de calos embriogênicos. Boxtel & Berthouly (1996) observaram que a indução de embriogênese somática em quatro genótipos desta espécie variou de 0% a 10%.

Segundo Berthouly & Etienne (1999), muitos genótipos de espécies do gênero *Coffea* ainda são de difícil regeneração em cultura de tecidos, apesar dos grandes avanços obtidos nos protocolos de indução de células

embriogênicas. Esta influência é claramente evidenciada pela variabilidade observada na frequência de indução de calos embriogênicos dos genótipos estudados no presente trabalho.

Apesar de, em geral, apresentarem melhor resposta para a indução de calos embriogênicos, diferenças entre genótipos de *Coffea canephora* também são frequentemente observadas (Berthouly & Michaux-Ferrire; 1996; Fuentes et al., 2000; Quiroz Figueroa, 2002; Santana et al., 2004, Gatica et al., 2007). Segundo esses autores, a formação de calos embriogênicos nessa espécie pode variar de 0% a 100%, dependendo do genótipo, do estado fisiológico da folha, do mês de coleta e da idade do explante.

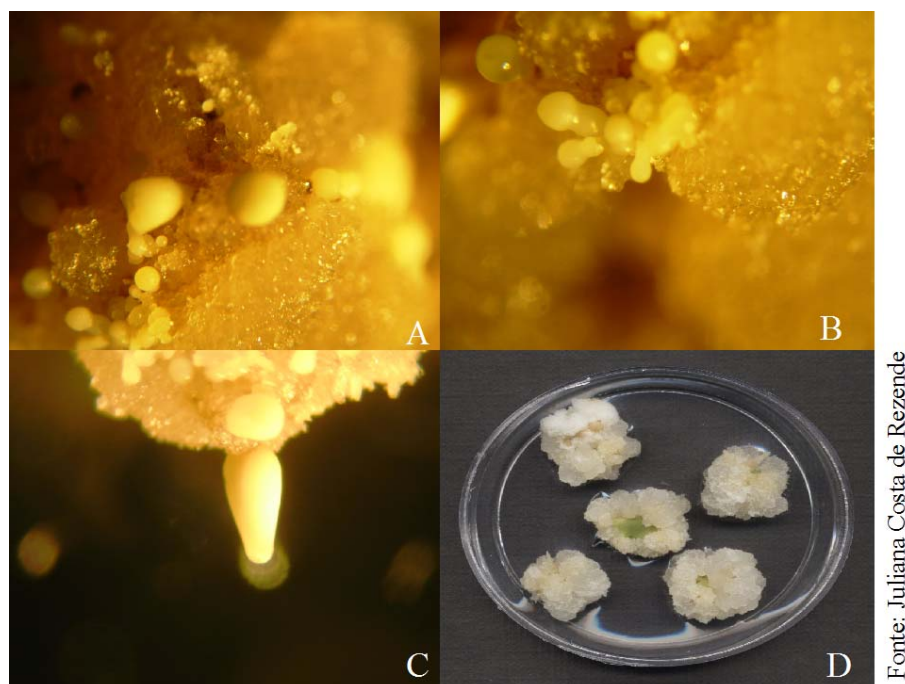
O potencial genotípico de resposta embriogênica também é reportado em outras plantas lenhosas, tais como *Citrus* (Gmitter & Moore, 1986) e melão (Yavad et al., 1990) e também em plantas herbáceas, como alfafa (Brown & Atamassov, 1985; Chen et al., 1987, Bianchi et al., 1988), milho (Hodges et al., 1986, Fahey et al., 1986, Close & Ludeman, 1987), trigo (Maes et al., 1996), arroz (Rines & McCoy, 1981) e cevada (Hanzel et al., 1985).

Para os genótipos 2.2 e 7.2, verificou-se a superioridade do meio de cultura Teixeira et al. (2004) em relação ao meio Boxtel & Berthouly (1996) (Tabela 6). Entretanto, no genótipo 4.2 observou-se o comportamento inverso, ou seja, a superioridade do meio Boxtel & Berthouly (1996). Os genótipos 3.0 e 5.0 apresentaram o mesmo comportamento em ambos os meios de cultura estudados.

Esses dois meios de cultura diferem, principalmente, em relação às concentrações de 2,4-D, 2- iP e IBA (Tabela 2). No meio de cultura Boxtel & Berthouly (1996), a concentração de 2,4-D é duplicada do meio C (2,26 $\mu$ M) para o meio E (4,52 $\mu$ M). De modo contrário, no meio de Teixeira et al. (2004), a concentração de 2,4-D é reduzida à metade, do meio PM (20,0 $\mu$ M) para o meio SM (10,0 $\mu$ M). Neste mesmo protocolo, as concentrações de 2- iP e de IBA utilizadas no meio PM são mantidas no

meio SM, porém, esses reguladores não são utilizados no meio secundário de Boxtel & Berthouly (1996). É provável que essas diferentes relações de auxina/citocinina utilizadas tenham influenciado na formação de calos embriogênicos dos genótipos estudados.

No presente trabalho, foi observada a formação de embriões em estágio globular (Figura 1A, 1B e 1C). Vale ressaltar que houve também a formação de calos friáveis não embriogênicos (Figura 1D), de coloração esbranquiçada e textura amorfa. Entretanto, este tipo de calo é de pouco interesse para trabalhos de micropropagação por não possuírem capacidade regenerativa de embriões somáticos (Teixeira et al., 2001).



Fonte: Juliana Costa de Rezende

FIGURA 1 Calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares após 180 dias de cultivo. A. e B. Embriões em estágio globular. C. Detalhe do embrião somático. D. Calos friáveis não embriogênicos.

## Experimento 2 – Potencial de formação de calos

Na Tabela 7 é apresentada a análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares, mantidos em meio de indução de calos, provenientes de folhas coletadas de genótipos elite. Houve diferença significativa entre os híbridos estudados ( $X_1$ ), evidenciada pelo teste de qui-quadrado, demonstrando que o genótipo influenciou na formação de calos embriogênicos.

TABELA 7 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares de genótipos elite. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo	53	247,57			
(2) $X_1$	9	123,40	124,17	44	3,299e <sup>-8*</sup>

\* significativo para o teste qui-quadrado, a 5% de significância.  $X_1$  = genótipo estudado.

Houve grande variabilidade para a indução de calos embriogênicos (Figura 2), com média percentual de 0 (genótipos 14-8; 14-3 e 8-10) a 53,3 (genótipo 5-14). Os genótipos 20-5, 10-1, 5-14 e 6-38 apresentaram maior formação de calos embriogênicos que os demais. Esses resultados estão em conformidade com aqueles obtidos no Experimento 1 do presente trabalho, reforçando a hipótese de que a produção de embriões somáticos é fortemente dependente de fatores genotípicos.

Os genótipos que apresentaram média percentual de indução de calos embriogênicos acima de 25% poderão ser utilizados para a produção de mudas clonais em escala comercial, de acordo com protocolo estudado (Teixeira et al., 2004). Por outro lado, há necessidade de otimizar o protocolo de indução de calos dos genótipos 14-8; 14-3 e 8-10, os quais não

apresentaram formação de calos embriogênicos, objetivando o processo de multiplicação clonal em escala comercial.

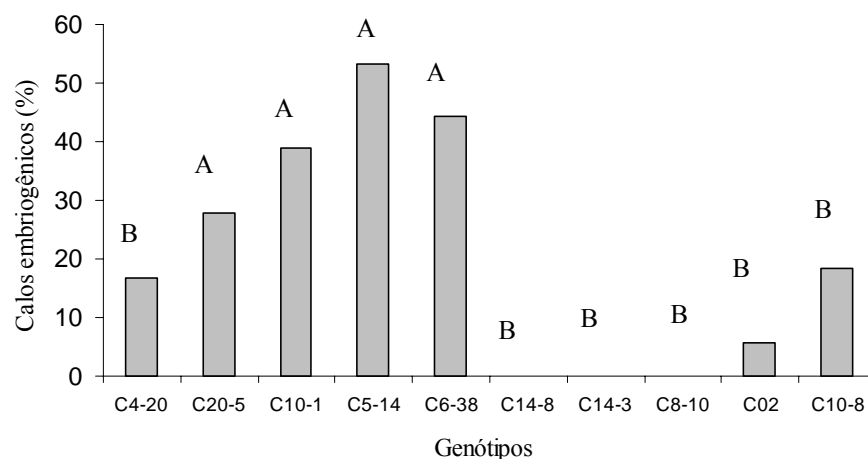


FIGURA 2 Valores médios da porcentagem de calos embriogênicos em explantes foliares de 10 genótipos elite com alta heterozigose. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

### Experimentos 3a e 3b -Influência dos níveis de 2-iP e 2,4-D

#### Experimento 3a

Na Tabela 8 é apresentada a análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares, inoculados em 17/12/2007 em meio de indução de calos com variações nos níveis de 2-iP e 2,4-D. Houve diferença significativa entre os tratamentos estudados ( $X_1$ ), pelo teste de qui-quadrado a 5% de significância, demonstrando que as combinações dos reguladores estudados influenciaram a formação de calos embriogênicos.

TABELA 8 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados em diferentes níveis de 2-iP e 2,4-D, inoculados em 17/12/2007. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo		190,716		77	
(2) X <sub>1</sub>	4	130,604	60,112	73	9,327e <sup>-6*</sup>

\*significativo para o teste qui-quadrado, a 5% de significância. X<sub>1</sub> = combinações dos níveis de 2-iP e 2,4-D

Houve grande variabilidade para a indução de calos embriogênicos nas diferentes concentrações de 2,4-D e 2-iP, com média percentual de 2,08 a 38,46 (Figura 3). Observa-se que o Tratamento 4 (20,0µM de 2,4-D e 20,0µM de 2-iP) apresentou maior porcentagem de calos embriogênicos, sendo estatisticamente superior ao Tratamento 1 (2,5µM de 2,4-D e 2,5µM de 2-iP), ao Tratamento 2 (2,5µM de 2,4-D e 20,0µM de 2-iP), ao Tratamento 3 (20,0µM de 2,4-D e 2,5µM de 2-iP) e ao Tratamento 5 (protocolo de Teixeira et al., 2004).

O aumento significativo da formação de calos embriogênicos somente ocorreu nas concentrações mais altas de ambos os reguladores de crescimento (20,0µM), indicando efeito sinérgico quando se utilizaram as doses mais elevadas de 2-iP e 2,4-D.

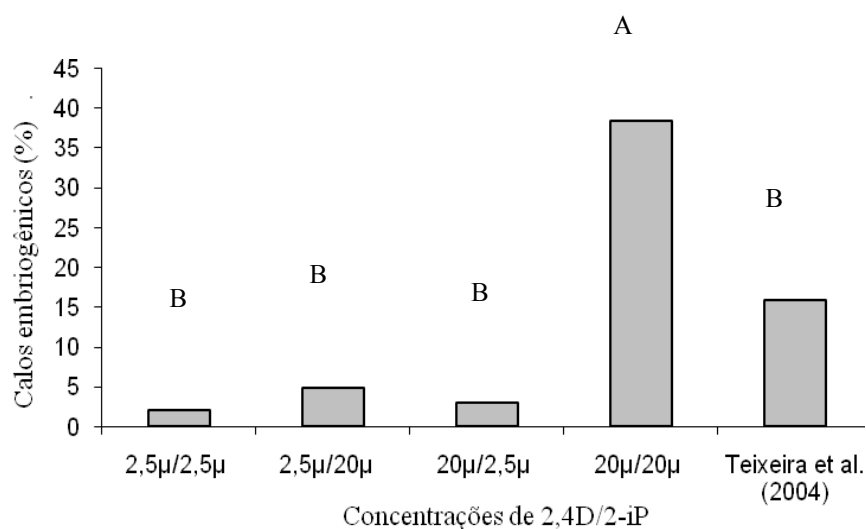


FIGURA 3 Valores médios da porcentagem de calos embriogênicos em explantes inoculados em 17/12/2007, em diferentes concentrações de 2,4-D e 2-iP. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

### Experimento 3b

Na Tabela 9 é apresentada a análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares, inoculados, em 07/03/2008, em meio de indução de calos com variações nos níveis de 2-iP e 2,4-D. Houve diferença significativa entre os tratamentos estudados ( $X_1$ ), evidenciada pelo teste de qui-quadrado, demonstrando que as combinações dos reguladores estudados influenciaram na formação de calos embriogênicos.

TABELA 9 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados em diferentes níveis de 2-iP e 2,4-D, inoculados em 07/03/2008. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo		89,970		70	
(2) X <sub>1</sub>	4	68,662	21,307	66	0,0002752*

\* significativo para o teste qui-quadrado, a 5% de significância. X<sub>1</sub> = combinações dos níveis de 2-iP e 2,4-D

A porcentagem de calos embriogênicos nos explantes inoculados em diferentes concentrações de 2,4-D e 2-iP variou de 0,0% a 10,26% (Figura 4). Observa-se que o Tratamento 3 (20,0µM de 2,4-D e 2,5µM de 2-iP), o Tratamento 4 (20,0µM de 2,4-D e 20,0µM de 2-iP) e o Tratamento 5 (protocolo de Teixeira et al. 2004) apresentaram maior porcentagem de calos embriogênicos, sendo estatisticamente superiores aos Tratamentos 1 (2,5µM de 2,4-D e 2,5µM de 2-iP) e ao Tratamento 2 (2,5µM de 2,4-D e 20,0µM de 2-iP).

Diferentemente do experimento 3a, o aumento significativo da formação de calos embriogênicos só ocorreu quando a concentração de 2,4-D foi de 20,0µM. Por outro lado, não houve resposta para o aumento da concentração de 2,5µM para 20,0µM de 2-iP quando o nível de 2,4-D era baixo (2,5µM), indicando que o aumento da concentração de 2,4-D foi mais importante que a concentração de 2-iP. Esses resultados coincidem com os encontrados por Teixeira et al. (2001), os quais relatam a formação de calo embriogênico de alta frequência em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, em altas concentrações de 2,4-D.

No experimento 3a obteve-se melhor resposta geral para a formação de calos embriogênicos. Considerando-se o tratamento 4, por exemplo, a formação de calos foi de 38,46%, enquanto que no experimento 3b a média percentual deste mesmo tratamento foi de 10,26%. Da mesma forma, no



Tratamento 5 obteve-se média percentual para a formação de calos de 15,83 no experimento 3a e de 7,78 no experimento 3b.

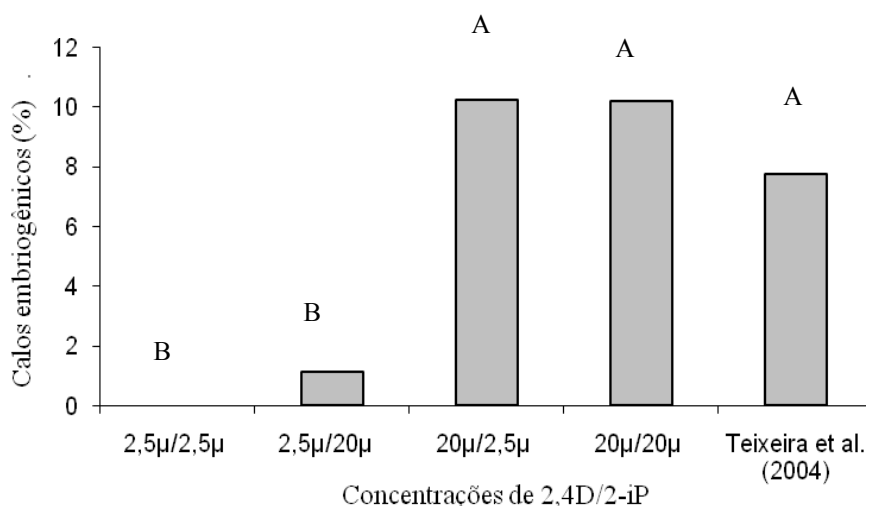


FIGURA 4 Valores médios da porcentagem de calos embriogênicos em explantes inoculados em 07/03/2008, em diferentes concentrações de 2,4-D e 2-iP. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

Essa diferença de resposta pode ser atribuída à época de coleta dos explantes. Segundo Pasqual (2001), alterações na temperatura, comprimento do dia, qualidade da luz e estresse hídrico ao longo do ano resultarão em plantas com alterações nos níveis de carboidratos, proteínas e reguladores de crescimento armazenados em seus tecidos.

Deve-se considerar que, em março, ocorre a fase de indução floral e, em dezembro, a fase de expansão dos frutos, no qual estes atingem seu tamanho máximo (Alves, 2008). Dessa forma, essa diferença de fatores fisiológicos do cafeeiro também pode ter influenciado na qualidade dos explantes e na formação de embriões somáticos. Diferentes estádios de maturação do explante (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996) e as condições ambientais nas quais as plantas matrizes são mantidas (Ammirato, 1983)

alteram a recalcitrância da embriogênese somática e sugerem que uma maior expressão da competência de um determinado genótipo para esta via de propagação requer condições particulares. No caso do presente trabalho, pode-se afirmar que a coleta em dezembro apresentou resultados satisfatórios à formação de calos embriogênicos.

## 6 CONCLUSÕES

A produção de embriões somáticos é fortemente dependente do genótipo.

A indução de calos depende da época de coleta dos explantes.

A relação de 2-iP e 2,4-D nos meios primário e secundário influencia na indução de calos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.D. Morfologia do cafeeiro. In: CARVALHO, C.H.S de. (Ed.). **Cultivares de café: origem, característica e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. v 1, p 33-55.

AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANCE, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of tissue culture**. New York: Macmillian, 1983. v.1, p.82-123.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; SHOLONVOIGT, A., N.; ETIENNE, H. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nurse. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.153-162, 2002.

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

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

- BIANCHI, S.; FLAMENT, P.; DATTEE, Y. Embryogene somatique et organogene in vitro chez la Luzerne: evaluation des potentialities des divers genotypes. **Agronomie**, v.8, p.121-126, 1988.
- BOXTEL, J. van; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.7-17, 1996.
- BYESSE, D.; GOFFLOT, A., MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal Botany**, v.71, p.1496-1502, 1993.
- BROWN, C.W.; ATAMASSOV, A. Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 4, p. 111-122, 1985.
- CHEN, T.H.H.; MAROWITCH, J.; THOMPSON, B.G. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfafa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.8, p.73-81, 1987.
- CLOSE, K.R.; LUDEMAN, L.A. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation of induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. **Plant Science**, v.52, p.81-89, 1987.
- DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café, Cacao, Thé**, v.25, p.237-241, 1981.
- FAHEY, J.W.; REED, J.N.; READY, T.L.; PACE, G.M. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. **Plant Cell Reports**, v.5, p.35-38, 1986.
- 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, n.60, p.5-13, 2000.
- GATICA, A.M.; ARRIETA, G.; ESPINOZA, A.M. Comparison of three in vitro protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra e Catuaí. **Agronomia Costarricense**, v.31, n.1, p.85-94, 2007.
- GMITTER, F.G.; MOORE, G.A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of Citrus: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.139-147, 1986.

- HANZEL, J.J.; MILLER, J.P.; BRINKMAN, M.A.; FENDOS, E. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. **Crop Science**, n.25, p.27-31, 1985.
- 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**, v.10, p.179-182, 1991.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.W.; BECWAR, M.R. Genotypic specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Biotechnology**, v.4, p.219-223, 1986.
- LOYOLA-VARGAS, V.M.; FUENTES C.; MONFORTE-GONZALES, M.; MENDEZ ZEEL M.; ROJAS R., MIJANGOS-CORTES J. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1999. p.302-307.
- MAES, O.C.; CHIBBAR, R.N.; CASWELL K.; LEUNG, N.; KARTHA, K.K. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. **Plant Science**, v.121, p.75-84, 1996.
- MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.155-203.
- MOLINA D., APONTE M., CORTINA H., MORENO G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.117-123, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, n.15, p.473-497, 1962.
- NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993, Montpellier. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1993. p.73-81.
- PASQUAL, M. **Introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

PIERSON, E.S.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N.; STARITSKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v.115, p.208-216, 1983.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Report**, v.20, p.1141-1149, 2002.

RINES, H.W; McCOY, T.J. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. **Crop Science** , v.21, p.837-842, 1981.

SANTANA N.; GONZALES, M.E.; VALCARCEL, M.; CANTO-FLICK, A.; HERNANDEZ M.; FUENTES CERDA, C.F.J.; BARAHONA, F.; MIJANGOS-CORTES, J.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. **In vitro Cellular and Development Biology– Plant**, v.40, p.95-101, 2004.

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

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

SÖNDAHL , M.R.; BRAGIN, A. Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1991. p.701-710.

TEIXEIRA, J.B.; ARIMURA, C.T.; JUNQUEIRA, C.S. Influência dos níveis de 2-iP e 2,4-D na embriogênese somática de folhas de plantas de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2001. p.386-392. CD-ROM.

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P. D.AC.; MELLO, R.I.S. de; SILVA, A.P.D. da, MUNDIM, D.A. **Multiplificação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Documentos).

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

YAVAD, R.C.; SALEH, M.T.; GRUMET, R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.207-214, 1990.

### **CAPÍTULO III**

## **INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS**

**EM *Coffea arabica* L.**

## 1 RESUMO

REZENDE, Juliana Costa de. Indução e multiplicação de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. In: \_\_\_\_\_. **Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L.** 2008. Cap. 3, p. 42-61. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a indução de calos embriogênicos de dois clones de *Coffea arabica*, selecionados para resistência à ferrugem e de alta produtividade e comparar a multiplicação desses calos em dois meios de cultura nos sistemas de cultivo gelificado e líquido. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, MG. Para a indução de calos foi utilizado o protocolo descrito por Teixeira et al. (2004), em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 33 repetições, sendo cada clone considerado um tratamento. A avaliação deste experimento foi realizada 180 dias após a instalação, por meio da contagem de calos embriogênicos formados. Para a multiplicação de calos, os tratamentos constituíram-se de dois meios de cultura (meio do estágio dois de Albarran et al., 2004 e meio de multiplicação de Teixeira et al., 2004) e dois sistemas de cultivo (gelificado e líquido). O delineamento experimental utilizado neste experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com 5 repetições por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 21, 42 e 63 dias após a instalação do experimento, por meio da pesagem dos calos. Verificou-se que os clones avaliados apresentam o mesmo potencial de formação de calos embriogênicos. O potencial de multiplicação de calos embriogênicos é influenciado pelo genótipo. O sistema gelificado apresentou maior eficiência na multiplicação de calos embriogênicos dos clones estudados quando comparado ao sistema líquido.

---

\* Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-orientador).



## 2 ABSTRACT

REZENDE, Juliana Costa de Rezende. Induction and multiplication of embryogenic callus in *Coffea arabica*. In: \_\_\_\_\_. **Indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* elite clones**. 2008. Chap. 3, p. 42-61. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

This work aimed to evaluate the embryogenic calli induction of two *Coffea arabica* clones selected for rust resistance and high yield, as well as to compare their multiplication in two media in both solid and liquid cultivation systems. The experiments were conducted at the Fundação Procafé Tissue Culture Laboratory in Varginha, MG. The protocol described by Teixeira et al (2004) was used for calli induction in a randomized – block design with 33 replications in which each clone was considered as a treatment. Its evaluation was carried out 180 days after installation, by counting the formed embryogenic calli. For calli multiplication the treatments were made up of two media (stage two of Albarran et al., 2004, and multiplication medium described by Teixeira et al., 2004) and two cultivation systems (solid and liquid). A randomized –block design with a 2 x 2 factorial arrangement with 5 replications per treatment was used. Evaluations were carried out at 21, 42, and 63 days after the experiment had been installed, by calli weighing. The clones studied had the same potential for the embryogenic calli induction. The embryogenic calli multiplication potential is influenced by the genotype. When compared to the liquid system, the solid system had the most influence upon the embryogenic calli of the clones studied.

---

\*Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática tem sido obtida em grande número de famílias e espécies de plantas e vem sendo utilizada para estudos básicos em fisiologia vegetal e aplicações mais práticas, como a micropropagação e a transformação genética de plantas. O grande potencial da embriogênese para multiplicação acelerada de plantas de café foi rapidamente notado desde os primeiros trabalhos (Staritsky, 1970; Sharp et al., 1973) e numerosas técnicas que simplificam este processo têm sido desenvolvidas com o intuito de permitir a produção em larga escala de plantas e de reduzir o custo de produção das mudas.

Calos embriogênicos podem continuar a dar origem a embriões somáticos durante muitas subculturas, por longos períodos. Segundo Pasqual et al. (1997), a continuação da produção de embriões somáticos depende da proliferação contínua de nódulos pró-embriogênicos de embriões somáticos jovens durante cada subcultura.

Alguns autores têm descrito protocolos visando à otimização da multiplicação de setores embriogênicos de café (Boxtel & Berthouly, 1996; Ducos et al., 2007). Estudos para estabelecer melhores protocolos foram realizados utilizando meio gelificado, porém, a taxa de multiplicação nestes meios mostrou-se muito baixa para seu uso na produção de plantas de café em larga escala (Söndahl & Sharp, 1977). Em vista disso, desde os primeiros trabalhos com café, houve várias tentativas, com diferentes graus de sucesso, para estabelecer protocolos de embriogênese somática em meio líquido (Staritsky & Hasselt, 1980; Baumann & Neuenschwander, 1990, Neuenschwander & Baumann, 1992; Afreen et al., 2002).

Diante dos fatos, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a indução de calos embriogênicos de dois clones de *C. arabica*, selecionados para resistência à ferrugem e de alta produtividade e comparar a multiplicação desses calos em dois meios de cultura nos sistemas de cultivo gelificado e líquido.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, MG, utilizando-se os clones 03 e 28, selecionados para resistência à ferrugem e alta produtividade. A planta matriz 03 é da população Siriema (*C. racemosa* x *C. arabica*) e apresenta também resistência ao bicho-mineiro. A planta matriz 28 foi selecionada do cruzamento de Catuaí Vermelho IAC 44 (Controle da UFV: VER 209-2 = UFV 2144-260 EL 7) x Híbrido de Timor CIFC 2750 (Controle da UFV: VER 209-2 = UFV 439-2).

No primeiro experimento, denominado de 01, avaliou-se o potencial de formação de calos embriogênicos a partir de explantes foliares dos clones 03 e 28. Folhas bem desenvolvidas, correspondentes ao terceiro par, foram coletadas dos ramos plagiotrópicos do terço médio de plantas matrizes adultas e conduzidas ao laboratório.

A assepsia constou de imersão em solução de álcool 70% por 1 minuto e desinfestação com hipoclorito de sódio, na concentração de 2,4% de cloro ativo, durante 15 minutos. Em seguida, as folhas foram enxaguadas por três vezes com água destilada autoclavada. Após autoclavagem a 121°C e 1 atm, por 20 minutos, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri de 0,9 x 10cm.

Foi utilizado o protocolo de indução de calos descrito por Teixeira et al. (2004). Inicialmente, os explantes foram cultivados em meio primário (PM), por 30 dias e, a seguir, transferidos para o meio secundário (SM), no qual permaneceram por 180 dias. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com 33 repetições, sendo 9 explantes por placa e cada placa considerada uma repetição.

A avaliação do experimento foi realizada 180 dias após a instalação, por meio da contagem de calos embriogênicos formados. Foram testados os ajustes para dois modelos: o primeiro com nenhum fator (nulo) e o segundo considerando o efeito principal do híbrido. Utilizou-se a análise da Deviance

e, após análise de resíduos, observou-se que o melhor ajuste foi obtido com a família quasibinomial e a função de ligação probit. Foi verificada a homogeneidade da variância e, sendo ela satisfatória, empregou-se o teste de comparação de médias Scott & Knott. As análises foram realizadas empregando-se a rotina GLM (*Generalized Linear Models*)\*, pelo fato de os dados de porcentagem não seguirem uma distribuição normal.

Os calos embriogênicos oriundos do experimento 01 foram multiplicados em meio de multiplicação (Teixeira et al., 2004), com renovação do meio a cada 21 dias, por 6 meses, até que atingissem a quantidade necessária para ser utilizada no experimento 02. Nesse experimento, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, sendo os tratamentos formados por dois meios de cultura (meio do estágio dois de Albarran et al., 2004 e meio de multiplicação de Teixeira et al., 2004) e dois sistemas de cultivo (meio gelificado e meio líquido), com cinco repetições.

O meio Teixeira et al. (2004) é composto por metade dos sais MS (Murashige & Skoog, 1962), tiamina ( $10\text{mg L}^{-1}$ ), piridoxina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), glicina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), L-cisteína ( $10\text{mg L}^{-1}$ ), caseína hidrolisada ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), extrato de malte ( $200\text{mg L}^{-1}$ ), ácido cítrico ( $250\text{mg L}^{-1}$ ), 2,4-D ( $5\mu\text{M}$ ), IBA ( $4,92\ \mu\text{M}$ ), 2iP ( $9,84\ \mu\text{M}$ ) e sacarose ( $20\text{g L}^{-1}$ ). O meio Albarran et al. (2004) é composto por metade dos sais MS, tiamina ( $10\text{mg L}^{-1}$ ), piridoxina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), glicina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), 2,4-D ( $4,5\mu\text{M}$ ) e cinetina ( $4,6\ \mu\text{M}$ ). Esse meio foi acrescido de caseína ( $100\text{mg L}^{-1}$ ) e sacarose ( $20\text{g L}^{-1}$ ). A todos os tratamentos gelificados foram acrescidos  $3,4\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel®.

Os meios tiveram seu pH ajustado para  $5,8\pm 0,1$ , utilizando NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, antes do processo de autoclavagem, realizado a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm, por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar foram vertidos 20mL

---

\*Aplicativo computacional R® (R, 2008)

dos meios líquidos em frasco do tipo Erlenmeyer, com capacidade de 125mL e, em seguida, inoculados 160mg de calos embriogênicos/frasco. Estes frascos foram vedados com papel laminado e mantidos em agitador orbital a 100 rpm, na ausência de luz e com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os meios gelificados foram vertidos em placa de Petri de 0,9 x 10cm e inoculados com nove setores embriogênicos de 60mg cada. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas em caixas de madeira, na ausência de luz, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Foram realizadas avaliações aos 21, 42 e 63 dias, por meio da pesagem dos calos, com o auxílio de uma balança de precisão colocada em câmara de fluxo laminar. A cada avaliação era renovado o meio de cultura e ajustada a quantidade inicial de calos, ou seja, de 160mg de calos embriogênicos, no caso dos frascos e de 9 setores embriogênicos de 60mg cada, no caso das placas de Petri.

A porcentagem de incremento dos calos I(%) foi calculada pela seguinte pela fórmula:  $I(\%) = [(MF \times 100)/(MF_{\text{inicial}})] - 100$ , em que MF é a massa fresca (g) avaliada a cada 21 dias e  $MF_{\text{inicial}}$ , a massa fresca de calos embriogênicos inoculados inicialmente no frasco ou na placa de Petri. A I(%) foi calculada no intuito de possibilitar a comparação entre o crescimento do meio líquido e do meio gelificado, pelo fato de terem concentrações iniciais diferentes.

A porcentagem de incremento dos calos foi analisada pelo procedimento GLM\*. Foi verificada a significância, a 5% de probabilidade, pelo teste t de Student. Detectando-se diferenças significativas entre os tratamentos e as interações, foram feitos os desdobramentos. Os genótipos foram analisados separadamente em experimentos independentes, já que não era objetivo do experimento 02 compará-los entre si.

---

\*Aplicativo computacional SAS® (SAS, 1990).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 01 - Indução de calos

Na Tabela 1 é apresentada a análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares, mantidos em meio de indução de calos, provenientes de folhas coletadas de dois clones. Não houve diferença significativa entre os clones estudados ( $X_1$ ), pelo teste qui-quadrado, demonstrando que o genótipo não influenciou na formação de calos embriogênicos.

TABELA 1 Análise de Deviance para a presença de calos embriogênicos formados a partir de explantes foliares dos clones 03 e 28. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Modelo	GL	Deviance residual	Diferença deviance	Diferença GL.	Valor p
(1) Nulo	57	40,835			
(2) $X_1$	1	0,507	40,327	56	0,514 <sup>ns</sup>

\*ns - não significativo para o teste qui-quadrado, a 5% de significância de 5%.  $X_1$  = genótipo estudado.  $X_1$ , clones 03 e 28.

Os dois clones estudados apresentaram porcentagem média de formação de calos embriogênicos muito semelhantes entre si (22% para o clone 03 e 20,31% para o clone 28), mesmo tratando-se de materiais de origens genéticas diferentes.

Esta média percentual de formação de calos também foi encontrada por outros autores. No primeiro trabalho sobre embriogênese somática de *C. arabica*, Söndahl e Sharp (1977) obtiveram 20% de formação de calos embriogênicos utilizando 5,4 $\mu$ M de ANA e 4,6 $\mu$ M de cinetina. Berthouly & Michaux-Ferriere (1996) obtiveram formação de calos embriogênicos em diferentes genótipos de *C. canephora* a partir de 20,8%, quando utilizado meio primário contendo 2,2 $\mu$ M de 2,4-D, 4,9 $\mu$ M de IBA e 9,8 $\mu$ M de 2-iP.

## **Experimento 02- Multiplicação de calos**

### **Massa fresca dos calos**

Observou-se que os tratamentos com meio gelificado apresentaram maiores produções de calos embriogênicos ao final de 63 dias que os tratamentos com meio líquido, para os dois clones estudados (Tabela 2). Vale ressaltar que não foi realizada análise estatística com o objetivo de comparar a massa fresca de calos dos sistemas de cultivo, devido à diferença da quantidade inicial de inóculo utilizada nos dois sistemas.

No sistema de cultivo gelificado, o clone 03 produziu, aos 63 dias, 5,06g de calos no meio Albarran et al. (2004) e 3,99g no meio Teixeira et al. (2004) gelificado. Para o sistema líquido, os meios Albarran et al. (2004) e Teixeira et al. (2004) apresentaram, aos 63 dias, 0,27g e 1,12g de calos, respectivamente. O clone 28, aos 63 dias, apresentou massa fresca de calos de 1,58g, para o meio Teixeira et al. (2004) e 0,99g, para o meio Albarran et al. (2004). Para o sistema de cultivo gelificado, a massa fresca de calos ao final deste período foi de 7,11g e 6,40g, para os meios Albarran et al. (2004) e Teixeira et al. (2004), respectivamente.

TABELA 2 Massa fresca dos calos embriogênicos (g), durante o período de cultivo, e aumento do peso após 63 dias, para cada meio de cultura e sistema de cultivo em estudo, para os clones 03 e 28. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Clone 03	Massa fresca (g)				Aumento do peso (vezes)
	Período de cultivo (dias)				
Meio de cultura/sistema	0	21	42	63	
Albarran et al. (2004) gelificado	0,54	1,07	2,55	5,06	9,37
Albarran et al. (2004) líquido	0,16	0,22	0,26	0,27	1,69
Teixeira et al. (2004) gelificado	0,54	1,06	2,37	3,99	7,39
Teixeira et al. (2004) líquido	0,16	0,38	0,56	1,12	7,00

Clone 28	Massa fresca (g)				Aumento do peso (vezes)
	Período de cultivo (dias)				
Meio de cultura/sistema	0	21	42	63	
Albarran et al. (2004) gelificado	0,54	1,18	3,35	7,11	13,16
Albarran et al. (2004) líquido	0,16	0,36	0,74	0,99	6,19
Teixeira et al. (2004) gelificado	0,54	1,02	2,60	6,40	11,85
Teixeira et al. (2004) líquido	0,16	0,42	0,60	1,58	9,87

Os clones estudados apresentaram diferentes respostas em relação ao aumento médio do peso. A variação do crescimento do clone 03 foi de 1,69 a 9,37 vezes, enquanto o clone 28 apresentou aumento médio do peso variando de 6,19 a 13,16 vezes. Se for considerado o meio Albarran et al. (2004) em sistema de cultivo gelificado, o qual apresentou maior crescimento, observa-se que, aos 63 dias, o clone 28 produziu 40,45% a mais que o clone 03. Esses resultados mostram que o potencial de multiplicação de calos embriogênicos é influenciado pelo genótipo.

#### Porcentagem de incremento dos calos



### Clone 03

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram significância para a porcentagem de incremento dos calos para os efeitos principais de sistema de cultivo e tempo, bem como para as interações entre fatores sistema de cultivo x meio de cultura, sistema de cultivo x tempo e sistema de cultivo x meio de cultura x tempo.

TABELA 3 Resumo da análise de variância para porcentagem de incremento dos calos, em função dos tratamentos estudados, para o clone 03. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
		Porcentagem
Sistema de cultivo (S)	1	503.477,16*
Meio de cultura (M)	1	68.091,47
S x M	1	279.167,92*
Erro parcela	14	51.746,49
Tempo (Tp)	2	811.985,31**
Tp x S	2	111.284,20**
Tp x M	2	19.226,86
Tp x S x M	2	121.011,34**
Erro subparcela	25	8.716,46
CV (%)		28,46

\*, \*\* significativo, pelo teste t de Student, a 5% e 1% de significância, respectivamente.

A interação sistema de cultivo x meio de cultura significativa mostra um comportamento diferenciado dos níveis do fator sistema de cultivo em cada nível do fator meio de cultura (Tabela 4). Para o meio de cultura Albarran et al. (2004), houve diferença significativa entre os sistemas de cultivo líquido e gelificado, sendo o gelificado estatisticamente superior em porcentagem de multiplicação de calos quando comparado ao líquido. Para o

meio de cultura Teixeira et al. (2004), não foi observada diferença significativa no comportamento dos sistemas de cultivo.

TABELA 4 Valores médios da porcentagem de incremento dos calos, em função dos sistemas de cultivo e meios de culturas estudados para o clone 03. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Sistema de cultivo	Meio de cultura <sup>1</sup>	
	Albarran et al. (2004)	Teixeira et al. (2004)
Líquido	67,07 b	304,62 a
Gelificado	436,15 a	359,64 a

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

Na Figura 1 observam-se os valores médios de porcentagem de incremento dos calos no clone 03, em função do tempo analisado, para cada meio de cultura e sistema de cultivo em estudo. Para o sistema de cultivo gelificado, estimam-se incrementos em torno de 17,61% ao dia, na multiplicação de calos quando se utiliza o meio Albarran et al. (2004) e de 12,92%, quando o meio de cultura utilizado foi o Teixeira et al. (2004). Para o sistema de cultivo líquido, o incremento foi de 1,25% e 12,72%, para os meios Albarran et al. (2004) e Teixeira et al. (2004), respectivamente.

Estes valores estão próximos aos relatados por Ducos et al. (1999), os quais quantificaram a multiplicação de células embriogênicas de *C. canephora* em meio líquido e encontraram uma taxa de crescimento de cerca de 6,6% a 13,3% ao dia, considerando a quantidade inicial de 1 grama de calo e um crescimento de biomassa de 2 a 3 vezes a quantidade inicial, a cada 15 dias.

Teixeira et al. (2004) observaram que o peso da matéria fresca, ao final de diferentes períodos de cultivo, variou de acordo com a densidade inicial de células, atingindo um valor máximo de crescimento de calos quando a densidade inicial foi de 8g.L<sup>-1</sup>, a mesma utilizada no presente

trabalho, no qual foi obtido um aumento médio de peso fresco de 9,8 vezes para o clone 28 e de 7,0 vezes, para o clone 03, aos 63 dias, quando utilizado o meio Teixeira et al. (2004). Corrobora, assim, os resultados encontrados por esses autores, os quais obtiveram aumento da densidade de células próximo a 10 vezes, após 56 dias de cultivo (Tabela 2).

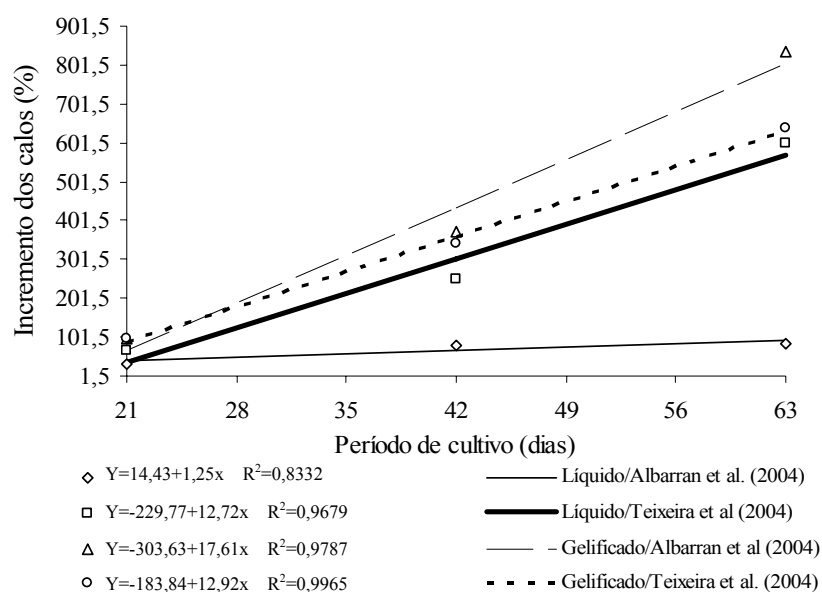


FIGURA 1 Valores médios de porcentagem de incremento de calos, em função do tempo analisado, para cada meio de cultura e sistema de cultivo em estudo no clone 03. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

### Clone 28

Os resultados, apresentados na Tabela 5, demonstram efeito significativo para os efeitos principais do sistema de cultivo e tempo, bem como para as interações entre os efeitos de sistema de cultivo x tempo e meio de cultura x tempo.

TABELA 5 Resumo da análise de variância para porcentagem de incremento dos calos, em função dos tratamentos estudados, para o genótipo 28. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
		Porcentagem
Sistema de cultivo (S)	1	614.903,00*
Meio (M)	1	389,63
S x M	1	63.011,69
Erro parcela	16	18.652,44
Tempo (Tp)	2	2.164.782,26**
Tp x S	2	377.693,77**
Tp x M	2	40.866,44*
Tp x S x M	2	10.843,17
Erro subparcela	28	8.268,59
CV (%)		21,53

\*, \*\* significativo pelo teste t de Student, a 5% e 1% de significância, respectivamente.

O incremento na porcentagem de multiplicação de calos, para o sistema de cultivo gelificado, foi superior quando comparado ao líquido (Figura 2). Estima-se um incremento em torno de 23,6% ao dia na multiplicação de calos quando se utiliza o sistema gelificado e de cerca de 10%, quando é utilizado o sistema de cultivo líquido. É provável que a menor taxa de crescimento observada nos meios líquidos seja devido à baixa oxigenação à qual ficaram expostas as suspensões celulares.

Segundo Curtis et al. (2005), o sistema de cultivo líquido pode provocar forte condição de anaerobismo, devido à redução do oxigênio dentro do tecido, causada pela limitação de transferência, causando limitações fisiológicas nos tecidos. De Feria et al. (2003) compararam a multiplicação de embriões em meio de cultura líquido com 50% e 80% de oxigênio dissolvido e obtiveram melhor multiplicação de calos e regeneração

de embriões em 80% de oxigênio dissolvido, provavelmente devido à melhor atividade metabólica das suspensões celulares neste meio.

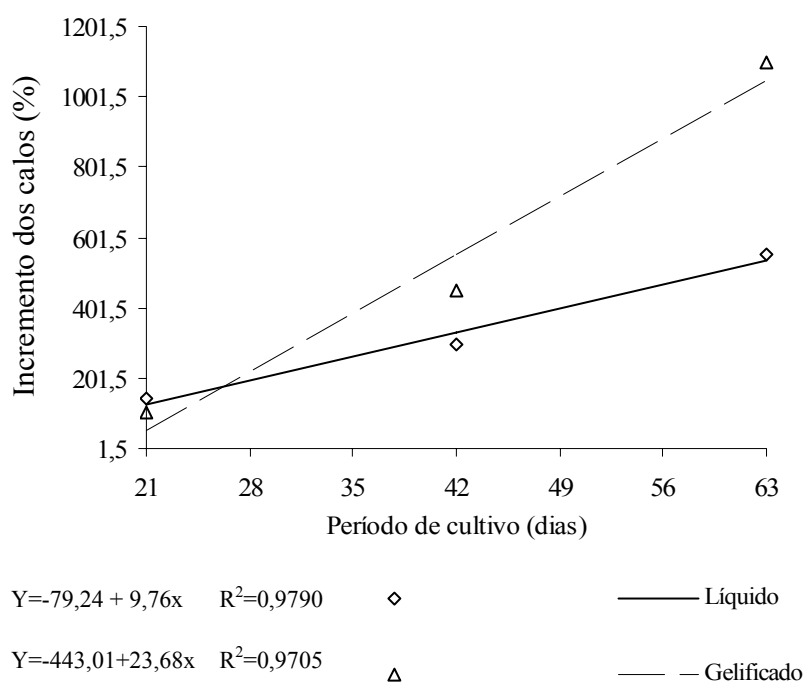


FIGURA 2 Valores médios de porcentagem de incremento dos calos, em função do tempo analisado, para cada sistema de cultivo em estudo no clone 28. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Embora o sistema de cultivo líquido empregado neste experimento tenha sido realizado sob condições de agitação, o que permite maior penetração de oxigênio no meio de cultura e melhoria da distribuição do oxigênio recém-solubilizado, ainda assim o sistema de cultivo gelificado apresentou maior crescimento de calos. Este fato pode ser explicado pela maior intensidade de oxigenação que ocorre superfície de meios sólidos, uma vez que os explantes estão em contato direto com o ar, fazendo com que o oxigênio fique mais disponível ao metabolismo (Pinto et al., 1995). Sendo assim, o emprego de agentes gelificantes cria condições para melhor

aeração das bases dos explantes. Vale ressaltar que o meio de cultura utilizado no presente trabalho foi o gelificado, no qual foram aplicadas baixas concentrações do agente gelificante, permitindo, assim, uma difusão de nutrientes no meio.

Apesar da maior eficiência do sistema de cultivo gelificado observada no presente trabalho, muitos autores afirmam que utilização de culturas líquidas é um pré-requisito para a automação e a redução dos custos em sistemas comerciais de propagação (Debergh, 1988; Adu-Ampomah et al., 1988; Aitken-Christie, 1991; Castillo et al., 1998). Entretanto, as vantagens da cultura em meio líquido são freqüentemente contrabalanceadas por outros problemas, tais como asfixia das células, hiperhidricidade, necessidade de equipamentos complexos (Etienne et al., 2006) e maior gasto de meio de cultura.

No presente trabalho, para o sistema de cultivo gelificado, foram utilizados 25mL de meio de cultura para a inoculação de 0,54g de calo, o que resultou num peso médio, ao final de 63 dias, de 4,25g, para o clone 03 e de 6,75g, para o clone 28 (Tabela 2). Para inocular os mesmos 0,54g de calo em meio líquido, seriam necessários 67,5mL de meio de cultura, o que representaria um acréscimo de, no mínimo, 227,5% no volume de meio a ser utilizado, considerando, ainda, que a taxa de crescimento no sistema líquido foi menor.

Na Figura 3 observam-se os valores médios de porcentagem de incremento de calos, em função do tempo analisado, para cada meio em estudo. Os incrementos na porcentagem de multiplicação de calos, para os meios Albarran et al. (2004) e Teixeira et al. (2004), foram bastante semelhantes entre si, cerca de 15,5% ao dia, quando se utilizou o meio Albarran et al. (2004) e, aproximadamente, 18% quando o meio Teixeira et al. (2004) foi utilizado, indicando que os dois meios de cultura apresentaram comportamentos muito próximos.

No meio proposto por Teixeira et al. (2004) são utilizadas duas auxinas (5,0 $\mu$ M de 2,4-D e 4,92 $\mu$ M de IBA) e uma citocinina (9,84 $\mu$ M de 2-

iP), enquanto que no meio Albarran et al. (2004) utilizam-se apenas uma auxina (4,5µM de 2,4-D) e uma citocinina (4,6µM de cinetina). Embora tenham sido utilizadas auxinas e citocininas em concentrações e tipos diferentes, os valores médios de porcentagem de incremento de calos foram bastante próximos, indicando que os calos embriogênicos apresentam grande plasticidade de resposta ao meio de cultura.

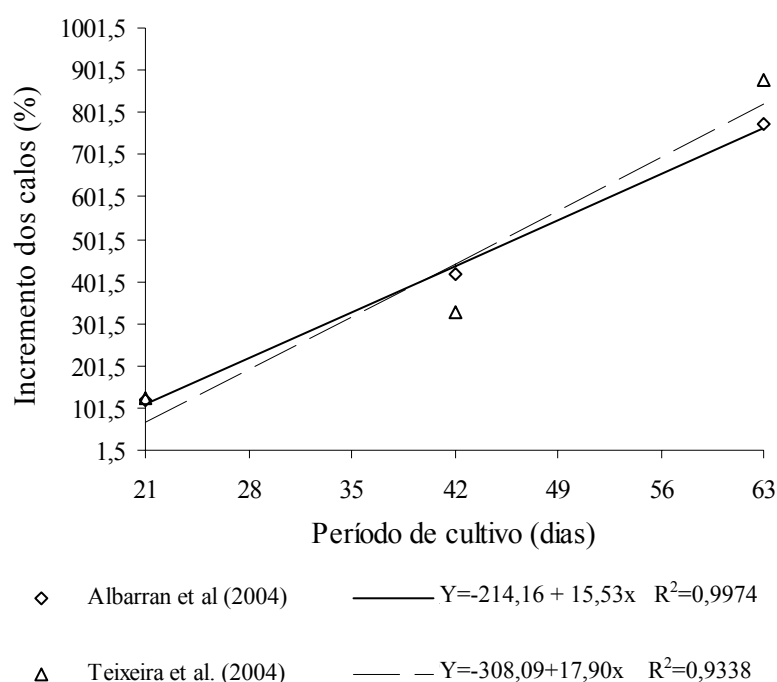


FIGURA 3 Valores médios, da porcentagem de incremento dos calos em função do tempo analisado, para cada meio de cultura em estudo no clone 28. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

## 6 CONCLUSÕES

Os clones avaliados apresentam o mesmo potencial de formação de calos embriogênicos. O potencial de multiplicação de calos embriogênicos é influenciado pelo genótipo. O sistema gelificado apresentou maior eficiência

na multiplicação de calos embriogênicos dos clones estudados quando comparado ao sistema líquido.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADU-AMPOMAH, Y.; NOVAK, F. J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M. Initiation and growth of somatic embryos of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Café, Cacao, Thé**, v.32, n.3, p.187-200, 1988.
- AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic cultura of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion form cotyledonary embryos. **Annals of botany**, v.90, p.21-29, 2002.
- AITKEN-CHRISTIE J. Automation. In: DEBERGH P.C.; ZIMMERMAN, R.J. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. The Netherlands: Kluwer Academic, Dordrecht, 1991. p.363-388.
- ALBARRAN, J.; BERTRAND, B.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.27-36, 2004.
- BAUMANN, T.W.; NEUENSCHWANDER, B. Tissue culture in coffee biotechnology. **Café, Cacao, The**, v.34, p.158-164, 1990.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, n.2, p.169-176, 1996.
- BOXTEL, J. van; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.7-17, 1996.
- CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L.; YADAVA, U.L. Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, London, v.73, n.3, p.307-311, 1998.
- CURTIS, W.R. Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.255-264, 2005.



DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y., LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiology Plantarum**, v.53, p.181-187, 1981.

De FERIA, M.; JIMENEZ, E.; BARBON, R.; CAPOTE, A.; CHAVEZ, M.; QUIALA E. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.1-16, 2003.

DUCOS, J.P.; GIANFORCARO, M.; FLORIN, B.; PÉTIARD, V.; DESHAYES, A. A technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: in vitro somatic embryogenesis. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1999. p.295-301.

DUCOS, J.P.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Bioreactors for coffee propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of plant developmental biology**, v.1, n.1, p.1-12, 2007.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.45-54, 2006.

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

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.608-612, 1992.

PASQUAL M.; CARVALHO, G. R.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações: melhoria genética de plantas**. Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 1997. v. 1.117.

PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; BARBOSA, M.H.P. Efeito do pH, de concentrações de sais e de ágar no enraizamento *in vitro* de Kielmeyra cariacaea (Spr.) Mart. Guttiferae. **Revista Ceres**, v.42, n.242, p.331-343, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 20 abr. 2008.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system**: procedures guide: version 6. Cary, NC: 1990. 705p.

SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CROCOMO, O.J.; MONACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, v.31, p.67-74, 1973.

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

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, v.19, p.509-514, 1970.

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

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P. da C.; MELLO, R.I.S. de; SILVA, A.P.D. da; MUNDIM, D.A. **Multiplificação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Documentos).

## **CAPÍTULO IV**

### **INFLUÊNCIA DE AUXINA E CITOCININA NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Coffea* *arabica*.**

## 1 RESUMO

REZENDE, Juliana Costa de. Influência de auxina e citocinina no desenvolvimento de embriões somáticos de *Coffea arabica*. In: \_\_\_\_\_. **Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L.** 2008. Cap. 4, p. 62-78. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

Na cultura de tecidos, a adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo é de suma importância. Objetivando avaliar o efeito de IBA e de BAP na fase final de desenvolvimento de embriões somáticos de *Coffea arabica*, foi conduzido um experimento no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, MG. Os tratamentos constituíram-se de variações no meio de crescimento (PRM) de Teixeira et al. (2004) descritos a seguir: meio PRM (tratamento 1), meio PRM sem BAP (tratamento 2), meio PRM acrescido de 1,47µM de IBA (tratamento 3) e meio PRM sem BAP acrescido de 1,47µM de IBA (tratamento 4). Para as análises estatísticas, foi isolado o efeito do BAP e do IBA e os tratamentos foram arrançados em um esquema fatorial 2 x 2 (presença e ausência de BAP, presença e ausência de IBA). Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 32 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25°C±2°C e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação do experimento foi realizada três meses após a instalação, por meio do comprimento da parte aérea, porcentagem de plântulas normais e porcentagem de plântulas com raízes. Verificou-se que, no protocolo empregado, não há necessidade da adição de IBA e BAP para a conversão de embriões somáticos em estádio cotiledonar para plântulas de *Coffea arabica*.

---

\*Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-orientador).

## 2 ABSTRACT

REZENDE, Juliana Costa de. Auxin and cytokinin influence in development of *Coffea arabica* somatics embryos. In: \_\_\_\_\_. **Indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* elite clones**. 2008. Chap. 4, p. 62-78. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

In tissue culture, the use of growth regulation in culture media is very important. This work was carried out at the Tissue Culture Laboratory of the Fundação Procafé in Varginha, MG, with the objective of evaluating both the IBA and BAP effect in final development phase of *Coffea arabica* L. somatic embryos. The treatments consisted of growth media variations (PRM) in Teixeira et al. (2004), described as follows: PRM medium (treatment 1), PRM media without the BAP (treatment 2), PRM media added of IBA (1,47 $\mu$ M) (treatment 3) and PRM media without the BAP added of IBA (1,47 $\mu$ M) (treatment 4). For statistical analyses both BAP and IBA effects were isolated, and the treatments were arranged in a 2 x 2 factorial scheme (presence and absence of both BAP and IBA). A randomized-block design with 20 replications was used. The flasks were kept in growth room with radiance level around 32  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperature of 25°C $\pm$ 2°C and day-light period of 16 hours. The evaluation was carried out three months after installation through plant aerial part length, normal plantlets percentage and rooted plantlets percentage. On the ground of the parameters evaluated, there is no need for IBA or BAP addition for *Coffea arabica* L. somatic embryos development.

---

\* Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

Técnicas da biotecnologia, incluindo a cultura de tecidos, têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores. No cafeeiro, os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *C. canephora*.

Posteriormente, diversos trabalhos envolvendo a espécie *C. arabica* foram desenvolvidos, no intuito de aumentar a taxa de indução e a multiplicação de calos embriogênicos, e a regeneração e desenvolvimento de plântulas (Zamarripa et al., 1991; Neuenschwander & Baumann, 1992; Barry-Etienne et al., 1999; Quiroz-Figueroa et al., 2002).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, as quais são sintetizadas em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas, sendo distribuídas para diferentes órgãos, nos quais exercem suas funções, inibindo ou estimulando processos fisiológicos e ou bioquímicos vitais. Substâncias com efeitos similares ao de fitormônios podem ser sintetizadas em laboratório e são denominadas reguladores de crescimento ou fitorreguladores (Taiz & Zeiger, 2004).

Na cultura de tecidos, a adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo é de suma importância, pois reproduz o que ocorre naturalmente na planta. Combinações entre essas substâncias propiciam melhor crescimento e desenvolvimento do explante e sua influência tem sido estudada na cultura *in vitro* de embriões de café (Carvalho et al., 1999; Pereira et al., 2007).

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 divisão, alongamento e diferenciação celular, além de serem responsáveis pela dominância apical (Taiz & Zeiger, 2004). De modo geral, baixas concentrações de auxinas favorecem o crescimento normal de embriões e o crescimento radicular, enquanto altas concentrações tanto apresentam efeito inibitório quanto favorecem a formação de calos (Raghavan & Srivastava, 1982, Pilet & Saugy, 1987).

As citocininas também possuem papel essencial no crescimento da parte aérea, uma vez que são responsáveis pelo controle da divisão celular (Hemerly et al., 1993; Jelenska et al., 2000), sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico (George & Sherrington, 1984). Entretanto, alguns autores afirmam que estas substâncias inibem o crescimento da parte aérea (Raghavan & Torrey, 1964) e do sistema radicular (Castro et al., 2007).

No cafeeiro, é comum a adição de BAP para aumentar o crescimento da parte aérea de embriões somáticos em fase inicial de germinação (Pereira, 2005) e da combinação de uma citocinina e uma auxina durante a fase cotiledonar (Andrade et al., 2001), para induzir a formação de raízes e completar a germinação do embrião.

Todavia, a resposta à adição de reguladores de crescimento depende das condições de cultivo a que os embriões estavam previamente submetidos e, principalmente, da concentração e do tipo dos reguladores de crescimento no meio de cultura. Diante dos fatos, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de IBA e de BAP na conversão de embriões somáticos em estágio cotiledonar para plântulas de *C. arabica*.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, Varginha, MG. Segmentos de folha do clone 20 (grupo Catucaí) foram inoculados em placas de Petri contendo o meio primário (PM) e, após um mês, transferidos para o meio secundário (SM), segundo o protocolo de Teixeira et al. (2004). Aos 180 dias após a inoculação dos explantes, os setores embriogênicos foram transferidos para o meio de regeneração, segundo o mesmo protocolo, suplementado com  $1\text{g.L}^{-1}$  de prolina, onde permaneceram por mais 70 dias, até a formação de embriões globulares. Ao final deste período, os embriões permaneceram por 120 dias em biorreatores do tipo RITA<sup>®</sup>, contendo o meio de regeneração (R) de Boxtel & Berthouly (1996), até que as folhas cotiledonares estivessem bem desenvolvidas (Figura 1A). Esses embriões em estágio cotiledonar foram utilizados como explantes no presente trabalho (Figura 1B), a fim de completarem o desenvolvimento até o estágio de plântulas.

Os tratamentos constituíram das seguintes variações no meio de crescimento (PRM) de Teixeira et al. (2004): meio PRM (tratamento 1), meio PRM sem BAP (tratamento 2), meio PRM acrescido de  $1,47\mu\text{M}$  de IBA (tratamento 3) e meio PRM sem o BAP acrescido de  $1,47\mu\text{M}$  de IBA (tratamento 4). Dessa forma, para as análises estatísticas, foi isolado o efeito do BAP e do IBA e os tratamentos foram arrançados em um esquema fatorial  $2 \times 2$  (presença e ausência de BAP, presença e ausência de IBA).

O meio PRM de Teixeira et al. (2004) é composto por metade dos sais DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), porém, no presente trabalho, estes sais foram substituídos pelos sais MS (Murashige & Skoog, 1962). Os demais reagentes que compõem o meio foram mantidos, ou seja, tiamina ( $10\text{mg L}^{-1}$ ), piridoxina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), glicina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), BAP ( $1,33\mu\text{M}$ ), sacarose ( $5\text{g L}^{-1}$ ) e glicose ( $10\text{g L}^{-1}$ ). Os meios foram suplementados com  $3,4\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel<sup>®</sup>.



Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , utilizando NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Em seguida, 50mL de cada meio foram vertidos em frascos de vidro com 10cm de altura e capacidade para 250mL, antes do processo de autoclavagem, realizado a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm, por 20 minutos. Após o resfriamento, os frascos foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram inseridos quatro embriões em estágio cotiledonar em cada frasco. Os frascos foram vedados com parafilme e mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas.

A avaliação do experimento foi realizada três meses após a instalação, analisando-se as variáveis comprimento da parte aérea, porcentagem de plântulas com raízes e porcentagem de plântulas normais. Foram contabilizadas como plantas normais somente àquelas que apresentaram aspecto normal, ou seja, fenótipo semelhante ao de plantas provenientes de sementes e parte aérea bem desenvolvida e vigorosa (Figura 1C).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento. A análise de variância foi realizada utilizando-se o procedimento GLM<sup>•</sup> e, quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos e entre as interações, as médias foram comparadas entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância. Os valores relativos à porcentagem de plântulas normais foram transformados por  $\arcsen(\sqrt{x})$ , por não apresentarem homogeneidade das variâncias.

---

• Aplicativo computacional SAS<sup>®</sup> (SAS, 1990)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Comprimento da parte aérea

Não houve significância para os efeitos principais da presença de BAP e IBA nos meios de cultura sobre o comprimento da parte aérea (Tabela 1). A interação entre estes fatores foi significativa, o que mostra um comportamento diferenciado dos níveis do fator BAP em cada nível do fator IBA e do fator IBA em cada nível do fator BAP.

TABELA 1 Análise de variância para o efeito da adição de BAP e de IBA sobre o comprimento médio da parte aérea de plântulas de *C. arabica*. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
BAP	1	0,5841
IBA	1	0,3662
BAP x IBA	1	0,8006*
Erro	36	0,2227
CV (%)		23,02
<sup>1</sup> Pr < W		0,4321

<sup>1</sup> teste de normalidade de Shapiro-Wilk. \*significativo, a 5%, pelo teste F.

Na presença de BAP, o comprimento da parte aérea foi estatisticamente igual na presença ou na ausência de IBA e, na ausência de BAP, este comprimento foi estatisticamente superior na ausência de IBA do que na sua presença (Tabela 2). Da mesma forma, na presença de IBA, o comprimento médio das plantas é estatisticamente igual ao comprimento na presença ou na ausência de BAP. Na ausência de IBA, o comprimento foi estatisticamente superior na ausência de BAP.

TABELA 2 Valores médios do comprimento da parte aérea de plantas de *C. arabica*, segundo os tratamentos estudados. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

IBA (1,47 $\mu$ M)	BAP (1,33 $\mu$ M)	
	Com	Sem
Com	1,92a A	1,87b A
Sem	1,81a B	2,44a A

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

Verifica-se, ainda na Tabela 2, que houve maior comprimento da parte aérea na ausência de ambos os reguladores de crescimento. Segundo Guerra et al. (1999), o efeito das auxinas no desenvolvimento de embriões somáticos é primariamente inibitório e se manifesta nos estádios subseqüentes ao globular. Isso foi demonstrado pelo trabalho de Newcomb & Wetherell (1970) em cenoura, os quais verificaram que, na presença apenas de 2,4-D, os embriões somáticos se desenvolviam até o estágio de pró-embrião. Desenvolvimento posterior para os estádios globular, cordiforme, cotiledonar e plantas adultas só ocorria em meio desprovido de 2,4-D. Da mesma forma, Raghavan & Torrey (1964) observaram a inibição do crescimento em orquídea com a utilização de citocininas.

### **Porcentagem de plântulas com raízes**

Os efeitos principais da adição de IBA e de BAP ao meio de cultura foram significativos (Tabela 3). Observa-se, pelos dados da Tabela 4, que o Tratamento 3, constituído pelo meio PRM acrescido de 1,47 $\mu$ M de IBA, não apresentou formação de sistema radicular, sendo estatisticamente inferior aos demais tratamentos estudados. Os resultados corroboram as observações de Hu & Ferreira (1998), os quais afirmam que reguladores de crescimento não necessitam ser adicionados ao meio de cultura de embriões, exceto quando o objetivo do trabalho é a multiplicação rápida.

Esse resultado pode ser atribuído à possibilidade de que os níveis naturais de auxina e citocinina das plantas tenham sido suficientes para proporcionar o desenvolvimento de raízes. Para Lane & Mc Dougald (1982), a necessidade de fornecimento de reguladores de crescimento aos meios de cultura está relacionada com a quantidade endógena que cada cultivar e cada explante possui e é também dependente do meio, da eficiência de transporte do regulador e do metabolismo deste.

No presente trabalho é possível também que os reguladores de crescimento utilizados nos meios anteriores à fase de formação de plântulas tenham condicionado um efeito residual, proporcionando condições adequadas ao desenvolvimento de raízes, dispensando o uso de reguladores nesta fase de desenvolvimento dos embriões somáticos.

TABELA 3 Análise de variância para o efeito da adição de IBA e ou BAP sobre a porcentagem de plântulas de *C. arabica* com raízes. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio <sup>1</sup>
BAP	1	2,2693**
IBA	1	2,8723**
BAP x IBA	1	0,8521
Erro	24	0,0687
CV (%)		52,41
<sup>2</sup> Pr < W		0,0511

<sup>1</sup>Valores transformados por  $\arcsen(\sqrt{x})$ ; <sup>2</sup>teste de normalidade de Shapiro-Wilk. \*\*significativo, a 1%, pelo teste F.

TABELA 4 Valores médios de plantas de *C. arabica* com raízes, segundo os tratamentos estudados. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

IBA (1,47 $\mu$ M)	BAP (1,33 $\mu$ M) <sup>1</sup>	
	Com	Sem
Com	0,00 b B	39,44 a A
Sem	42,69 a A	54,64 a A

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t de Student, a 5% de significância.

Em contrapartida, alguns autores que afirmam que auxinas e citocininas são necessárias em pequenas concentrações, para haver crescimento normal da parte aérea (Andrade et al., 2001) e do sistema radicular (Pilet & Saugy, 1987). Por exemplo, em abetos (*Pinaceae*), 12% dos calos com embriões formaram plantas quando transferidos para o meio MS, contendo 5,0 $\mu$ M de 2,4-D e 5,0 $\mu$ M de cinetina (Hakman & Arnold, 1985). Em mandioca, o cultivo de embriões somáticos com 4mm de comprimento, em meio MS suplementado com 0,44 $\mu$ M de BAP e 0,04 $\mu$ M de 2,4-D, favoreceu a formação rápida de raízes e de partes aéreas (Stamp & Henshaw, 1982).

#### **Porcentagem de plântulas normais**

Cerca de 60% dos embriões cotiledonares colocados nos meios em estudo não se desenvolveram bem, formando plântulas muito pequenas, com baixo desenvolvimento da parte aérea ou plântulas anormais. Esses resultados se aproximam dos de Ducos et al. (2007), os quais obtiveram uma taxa de conversão de embriões somáticos de café robusta em plantas estimada em 46%, após a germinação completa em casa de vegetação. Da mesma forma, Barrueto Cid & Cruz (2002), ao transferirem embriões somáticos de *C. arabica* cv. Rubi, Catuaí Vermelho 81 e Iapar 59 para o meio SP de germinação e crescimento observaram a ausência de

desenvolvimento de raiz ou parte aérea. Estes embriões foram caracterizados como anormais, ocorrendo em, aproximadamente, 33% dos casos.

A adição de IBA e de BAP, isoladamente, ou em conjunto, não aumentou a formação de plântulas normais (Tabela 5). Observa-se, pelos dados da Tabela 6, que, na ausência do BAP, houve desenvolvimento de 44,84% de plântulas normais e, na presença deste regulador, esta porcentagem foi de 36,50%. Esta porcentagem foi bastante semelhante quando considerados os níveis de IBA (40,53% e 40,81% de plântulas normais na presença e na ausência do regulador, respectivamente) (Tabela 6). Dessa forma justifica-se a utilização do meio de cultura sem a adição desses reguladores, com o objetivo de redução dos custos.

Vale ressaltar que as plântulas normais obtidas no presente trabalho foram transferidas para casa de vegetação, apresentando desenvolvimento normal e fenótipo idêntico ao de plantas originadas por sementes (Figura 1D).

TABELA 5 Análise de variância para o efeito da adição de IBA e ou BAP sobre a porcentagem de plântulas normais de *C. arabica*. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
BAP	1	325,8986 <sup>ns</sup>
IBA	1	0,3410 <sup>ns</sup>
BAP x IBA	1	24,1328 <sup>ns</sup>
Erro	24	337,9001
CV (%)		44,75
<sup>1</sup> Pr < W		0,0535

<sup>1</sup>teste de normalidade de Shapiro-Wilk. <sup>ns</sup>não significativo, pelo teste F.

TABELA 6 Valores médios da porcentagem de plântulas normais de *C. arabica* segundo os níveis de BAP. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

BAP (1,33 $\mu$ M)	Médias
Com	36,50%
Sem	44,84%

TABELA 7 Valores médios da porcentagem de plântulas normais de *C. arabica* segundo os níveis de IBA. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2008.

IBA (1,47 $\mu$ M)	Média
Com	40,53%
Sem	40,81%

## 6 CONCLUSÕES

No protocolo empregado não há necessidade da adição de IBA e BAP para a conversão de embriões somáticos em estágio cotiledonar para plântulas de *C. arabica*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.M. da C.O.; 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**, v.25, n.5, p.1063-1070, set./out. 2001.

BARRUETO CID, L.P.; CRUZ, A.R.R. Embriogênese somática em *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 1999, Vitória. **Anais...** Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2001. p.349-355. CD-ROM.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos massproduced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.111-117, 1999.

BOXTEL, J.van; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.169-176, 1996.

CARVALHO, G.R.; PIO, R.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; SCARANTE, M.J. Efeitos do ácido giberélico e benzilaminopurina no desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, p.185-187, 1999.

CASTRO, P.R. de C.; PITELLI A. M. de C. M.; PERES L.E. P.; ARAMAKI, P. H. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Ciências Exatas Terra, Ciências Agrônômicas e Engenharia**, v.13, n.3, p.25-29, dez. 2007.

DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, v.190, p.507-509, 1984.

DUCOS, J.P.; LABBE, G.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 6, 2007.

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

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

HAKMAN, I.; ARNOLD, S.V. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). **Journal of Plant Physiology**, v.121, p.149-158, 1985.

HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.; ENGLER, J.A.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZE, D. cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. **Plant Cell**, v.5, p.1711-1723, 1993.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. . In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação**



**genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.71-83.

JELENSKA, J.; DECKERT, J.; KONDOROSI, E.; LEGOCKI, A.B. Mitotic B-type cyclins are differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. **Plant Science**, v.150, p.29-39, 2000.

LANE, W.D.; Mc DOUGALD, J.M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.62, p.689-694, 1982.

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

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.10, n.608-612, 1992.

NEWCOMB, W.; WETHERELL, D.F. The effects of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. **Botanical Gazette**, v.131, p.242-245, 1970.

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

PEREIRA, A.R.; CARVALHO, S.; PEREIRA de; PASQUAL M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.

PILET, P.E.; SAUGY, M. Effect on root of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, v.83, p.33-38, 1987.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.

RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P.S. Embryo culture. In: JOHRI, B.M. (Ed.). **Experimental embryology of vascular plants**. Berlin: Springer Verlag, 1982. p.195-230.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.51, n.3, p.264-274, Mar. 1964.

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

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposium for the Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

STAMP, J.A., HENSHAW, G.G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, p. 183-187, 1982.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, v.19, p. 509-514, 1970.

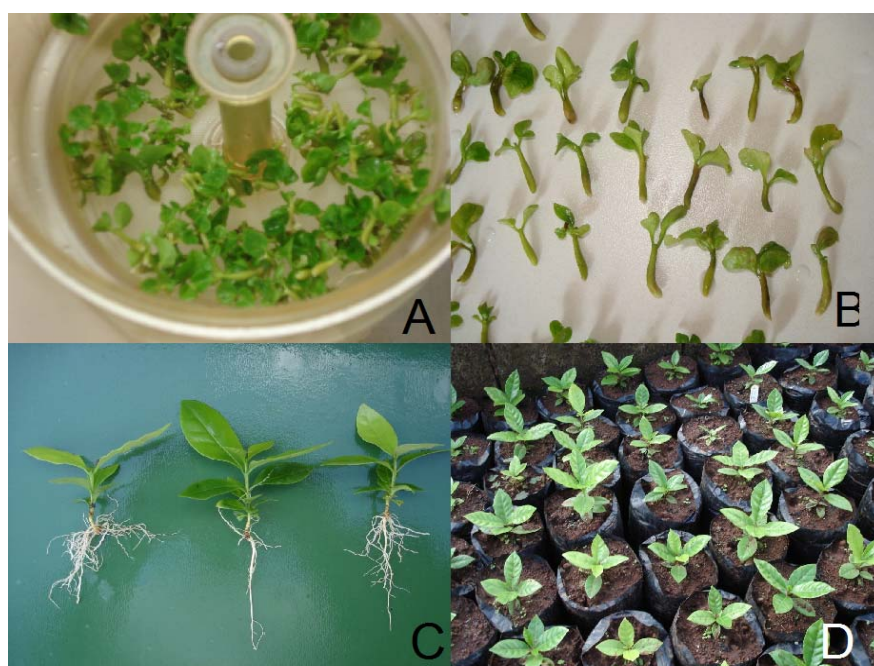
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P. DA C.; MELLO, R.I.S. de; SILVA, A.P.D. da; MUNDIM, D.A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Documentos).

ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; TESSERAU, H.; BOLLON, H.; ESKES, A.; PÉTIARD, V. Développement d' un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogénese somatique en milieu liquide. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1991. p.392-402.

## 8 ANEXO

FIGURA 1 A. Embriões somáticos de *C. arabica*, após 120 dias em biorreatores do tipo RITA<sup>®</sup>. B. Embriões em estágio cotiledonar, utilizados como explantes. C. Plântulas desenvolvidas em meio de crescimento que apresentaram desenvolvimento normal. D. Plântulas somáticas aclimatizadas ao final do experimento.



Fonte: Carlos Henrique S. de Carvalho

**CAPÍTULO V**

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE CAFEIROS  
PROPAGADOS VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

## 1 RESUMO

REZENDE, Juliana Costa de. Características agronômicas de cafeeiros propagados via embriogênese somática. 2008. In: \_\_\_\_\_. **Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L.** 2008. Cap. 5, p. 79-91. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

Objetivou-se, com a realização deste estudo, comparar características agronômicas de plantas de *C. arabica* provenientes de sementes com plantas produzidas via embriogênese somática. O experimento foi implantado, em janeiro de 2005, na Fazenda Experimental do MAPA/Fundação Procafé, situada no município de Varginha, MG. Utilizou-se a cultivar Catuaí Vermelho IAC 44, em delineamento experimental de blocos casualizados, com dez repetições. As parcelas foram constituídas de dez plantas, considerando-se como úteis as seis plantas centrais. As avaliações foram realizadas na primeira colheita, dois anos e meio após a instalação, compreendendo as seguintes características: altura da planta, diâmetro de copa, produção de grãos, rendimento, classificação por peneira, estágio de maturação dos frutos e porcentagem de frutos chochos. Observou-se que plantas provenientes de embriogênese somática apresentaram maior diâmetro de copa que as provenientes de sementes, não havendo diferenças significativas para as demais características avaliadas. Plantas provenientes de embriogênese somática não apresentam, pela inspeção visual, qualquer alteração no fenótipo para forma, cor, arquitetura de planta, tempo de florescimento e vigor. Assim, o comportamento de plantas de *Coffea arabica* produzidas via embriogênese somática é semelhante ao de plantas oriundas de sementes, não havendo limitações agronômicas para a sua utilização.

---

\*Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-orientador).

## 2 ABSTRACT

REZENDE, Juliana Costa de. Agronomic performance of somatic embryogenesis-derived coffee plants. In: \_\_\_\_\_. **Indirect somatic embryogenesis in *Coffea arabica* elite clones**. 2008. Chap. 5, p. 79-91. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

This work aimed to compare agronomical characteristics of *Coffea arabica* L. plants derived from seeds with plants produced through somatic embryogenesis. The experiment was installed on the MAPA/Fundação Procafé, Experimental Farm in Varginha, MG, Brazil, in January 2005. The Catuaí Vermelho IAC 44 was the cultivar studied. A randomized-block design with 10 replications and ten plants per plot was used. Only the plants in the center of the plots (6) were studied. On the first harvest the following parameters were evaluated: yield, plant height, length of lateral branches, bean size, bean/fruit weight ratio, fruit maturation stage, floating grains percentage, and seed quality. Except for the length of lateral branches, in which somatic embryogenesis-derived plants were higher than seed-derived plants, no other parameters evaluated were statistically different for both propagation methods. A visual inspection did not detected any significant abnormal phenotype for color, plant architecture, blossoming time and plant vigor. These results indicate that there is no restriction for commercial use of *Coffea arabica* plants produced by somatic embryogenesis.

---

\*Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – Embrapa (Co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético do cafeeiro por meio de métodos convencionais, principalmente hibridação seguida de avaliação de progênies e seleção de populações, retrocruzamentos e cruzamentos interespecíficos, é um processo demorado, podendo ser necessário mais de trinta anos para se obter uma nova cultivar.

A regeneração de plantas por meio da embriogênese somática representa uma alternativa vantajosa para a propagação e o melhoramento genético de plantas de café, possibilitando a seleção precoce de material, em larga escala e em curto espaço de tempo. Esta técnica pode ser aplicada para a rápida produção em massa de clones selecionados de *C. canephora*, para híbridos interespecíficos, como o Arabusta e, principalmente, em genótipos de *C. arabica*, para a qual a produtividade superior de híbridos já foi demonstrada, no Kenia (Vossen & Walyaro, 1981), Etiópia (Ameha, 1983) e na América Central (Bertrand et al., 2005).

Alguns autores têm demonstrado que a embriogênese somática é o melhor método para a propagação em massa de híbridos de *C. arabica* (Söndahl & Sharp, 1977; Etienne et al., 1997; Etienne & Bertrand, 2001), principalmente quando a produção de embriões somáticos é feita utilizando-se biorreatores de imersão temporária (Zamarripa et al., 1991; Etienne et al., 1997; Afreen et al., 2002; Albarran et al., 2004).

Etienne-Barry et al. (1999) demonstraram a possibilidade de semear embriões germinados, produzidos em biorreatores de imersão temporária, diretamente no substrato utilizado para a produção de mudas. Neste processo, a conversão dos embriões em plântulas é realizada diretamente no substrato final, reduzindo custos, tempo, mão-de-obra e espaço laboratorial.

Ducos et al. (2007) demonstraram que a embriogênese somática pode ser usada para propagação em larga escala de clones de materiais elite de *C. canephora*. De acordo com esses autores, por meio de 1 kg de calo embriogênico, 4,4 milhões de embriões somáticos foram produzidos em um

período de três anos. Ao final do processo, foram obtidas 600.000 plantas, que estão sendo conduzidas em campo de países produtores de café.

Entretanto, existem poucos relatos sobre o comportamento em campo de plantas de *C. arabica* provenientes de embriogênese somática, principalmente em relação ao crescimento vegetativo e a características produtivas. Diante dos fatos, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar características agrônômicas de plantas de *C. arabica* provenientes de sementes e de embriões somáticos.

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Instalou-se um experimento, em condições de campo, em janeiro de 2005, na Fazenda Experimental do MAPA/Fundação Procafé, situada no município de Varginha, na região Sul de Minas Gerais, com altitude média de 1.000m.

Os tratamentos constaram de duas formas de propagação: via embriogênese somática indireta e via semente. As plantas propagadas via embriogênese somática indireta foram cedidas, ainda *in vitro*, pelo Dr. João Batista Teixeira, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e, para o processo de aclimatização, foram transplantadas para sacos plásticos contendo substrato usualmente empregado para a formação de mudas de café. As plantas oriundas de sementes foram produzidas em sistema de meio ano. Em ambos os tratamentos, utilizou-se a cultivar Catuaí Vermelho IAC 44.

O experimento foi implantado em blocos casualizados, com dez repetições e espaçamento de 3,50 x 0,80m. As parcelas foram constituídas por linhas de dez plantas, considerando-se como úteis as seis plantas centrais. Foram utilizados os tratos culturais normalmente empregados para a cultura do café na região.

As avaliações foram realizadas aos dois anos e meio após o plantio, compreendendo as seguintes características: altura da planta, diâmetro de



copa, produção de grãos, rendimento, classificação por peneira, estágio de maturação e porcentagem de frutos chochos. A altura da planta foi medida a partir do solo, com auxílio de uma trena. O diâmetro de copa foi obtido medindo-se a distância entre as duas extremidades dos ramos plagiotrópicos posicionados no terço médio da planta.

O estágio de maturação dos frutos foi realizado calculando-se a porcentagem de frutos nos estádios verde, cereja, passa e seco, por meio de contagem de amostras de 200 frutos por parcela. A porcentagem de frutos chochos foi realizada utilizando-se a metodologia proposta por Antunes Filho & Carvalho (1957), pela qual colocam-se 100 frutos cereja em água, sendo considerados chochos aqueles que permaneceram na superfície.

A produção foi medida pesando-se os frutos imediatamente após a colheita e, a seguir, separam-se 2 litros de café de cada parcela para secagem ao sol. Depois de seco, o café em coco foi pesado, beneficiado e pesado novamente para calcular o rendimento, o qual foi obtido dividindo-se o peso da amostra de café beneficiado pelo peso do café em coco. Utilizaram-se 200 gramas de café beneficiado de cada tratamento para classificação por peneira. O café foi classificado quanto ao formato do grão e à sua granulometria, ou seja, chato graúdo, que fica retido nas peneiras 19/18 e 17 (Brasil, 2003), sendo os dados expressos em porcentagem.

Foram realizadas inspeções visuais em relação ao fenótipo anormal, com especial atenção para características vegetativas (diferenças entre pigmentação de folhas, vigor e arquitetura das plantas), florescimento (ausência de flores, floração precoce ou tardia), frutificação (morfologia, tamanho e coloração, maturação tardia ou precoce e anomalia dos grãos) e mortalidade das plantas provenientes de embriogênese somática.

Após a coleta, os dados foram compilados e analisados estatisticamente\*. Foi verificada a significância, a 5% de probabilidade, pelo teste F e, detectando-se diferenças entre os tratamentos, as médias foram

---

\*Aplicativo computacional SAS® (SAS, 1990).

comparadas pelo teste de Tukey. As variáveis altura de planta, diâmetro de copa, produção e porcentagem de grãos nos estádios verde, cereja, passa e seco foram transformadas por meio de  $\log(\text{variável})$ , por apresentarem heterogeneidade das variâncias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo somente para diâmetro de copa das plantas (Tabela 1), não sendo detectadas diferenças significativas para as demais características analisadas (altura da planta, produção, rendimento, classificação por peneira, estágio de maturação dos frutos e porcentagem de frutos chochos).

Outros autores também constataram a similaridade entre plantas de propagação vegetativa e seminífera em *C. arabica*. De 1996 a 2000, uma plantação em larga escala, formada a partir de plântulas somáticas de 10 clones de robusta, foi conduzida em cinco países produtores de café. Neste trabalho, nas Filipinas e na Tailândia, um total de 5.067 plantas originadas de células embriogênicas foram comparadas com plântulas originadas de microestaquia *in vitro*. Não foram observadas diferenças significativas quanto a características agrônômicas e à produção de frutos (Ducos & Petiard, 2003; Ducos et al., 2003).

Segundo Barry-Etienne et al. (2002), a composição mineral de folhas de plantas provenientes de embriões somáticos regenerados em substratos foi similar à de plantas provenientes de sementes. Da mesma forma, Etienne e Bertrand (2001) também observaram que a produtividade de híbridos derivados de células em suspensão com cinco meses de idade e de plantas obtidas por estaquia foi idêntica, embora a frequência de plantas classificadas como fora do padrão tenha sido de cerca de 2,1%, nas plantas oriundas de células em suspensão.

TABELA 1 Análise de variância para altura da planta (Alt), diâmetro de copa (DC), produção (Prod), rendimento (Rend), porcentagem de grãos chochos (Ch), cereja (Cer), verde (Ve), passa (Pa), seco (Se) e chato graúdo (CG) da cultivar Catuai Vermelho IAC 44 provenientes de sementes e de embiogênese somática. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Fonte de variação	Quadrado médio										
	GL	Alt	DC	Prod	Rend	Ch	Cer	Ve	Pa	Se	CG
Bloco	9	0,0004	0,0006	7,5311	43,4261	8,5611	231,1378	281,2108	2,4440	1,5094	91,9852
Tratamento	1	0,0003	0,00408*	24,0243	15,0337	36,4500	289,9411	197,3176	1,2251	3,5112	15,5761
Erro	9	0,0001	0,0003	5,7277	78,9244	13,6722	86,5594	127,8119	2,9252	1,9618	46,9205
CV(%)		4,34	5,40	33,90	17,56	69,11	15,74	29,65	12,37	10,08	17,32

\*significativo, a 1% de probabilidade.

TABELA 2 Valores médios de altura da planta (Alt), diâmetro de copa (DC), produção (Prod), rendimento (Rend), porcentagem de grãos chochos (Ch), cereja (Cer), verde (Ve), passa (Pa), seco (Se) e chato graúdo (CG) da cultivar Catuai Vermelho IAC 44 provenientes de sementes e de embiogênese somática. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2007.

Origem das plantas	Valores médios										
	Alt (m)	DC (m)	Prod (kg/pl.)	Rend (%)	Ch (%)	Cer (%)	Ve (%)	Pa (%)	Se (%)	CG (%)	
Embiogênese	1,08	1,38	8,16	49,72	6,70	34,99	62,90	1,13	0,97	38,65	
Semente	1,04	1,23	5,96	52,41	4,00	41,28	55,29	1,63	1,81	40,42	

Situação similar foi observada em outras culturas. Webster et al. (1990), trabalhando com abeto vermelho (*Pinaceae*), mostraram que as taxas de crescimento, altura e morfologia de brotos e raízes foram similares em plantas provenientes de sementes e de embriões somáticos. Da mesma forma, plantas regeneradas de *Trifolium fragiferum*, derivadas de embriões somáticos desenvolvidos em casa de vegetação, foram morfológicamente similares a plantas derivadas de sementes (Rybczynski, 1997). Díaz-Pérez et al. (1995), ao levarem para condições *ex vitro* plantas micropropagadas de macieira, observaram que os sistemas radiculares desenvolvidos tinham características qualitativas similares às do sistema radicular proveniente de sementes.

As plantas provenientes da embriogênese somática apresentaram maior diâmetro de copa em relação a plantas provenientes de sementes (Tabela 2). Partelli et al. (2006) também observaram maior crescimento de ramos plagiotrópicos em cafeeiros conilon propagados por estaquia em relação a cafeeiros propagados por sementes. Esses autores também não observaram diferenças em relação à altura de plantas produzidas por sementes e por estacas.

Bragança et al. (2001) relatam que os ramos plagiotrópicos se formam na axila foliar do primeiro ou do segundo par de folhas das mudas propagadas vegetativamente, e nas mudas de semente só se formam depois do nono, décimo ou décimo primeiro par da axila foliar. Este comportamento foi observado no presente trabalho, o que permitiu a antecipação da emissão de ramos plagiotrópicos e, conseqüentemente, maior crescimento destes, nas mudas micropropagadas, quando levadas para condições *ex vitro*.

Não foi observada qualquer alteração no fenótipo das plantas provenientes de embriogênese somática em relação a características vegetativas (diferenças entre pigmentação de folhas, vigor e arquitetura das plantas), florescimento (ausência de flores, floração precoce ou tardia), frutificação (morfologia, tamanho e coloração, maturação tardia ou precoce e anomalia dos grãos) e mortalidade das plantas, corroborando os dados de

Ducos & Petiard (2003) e Ducos et al. (2003), os quais não observaram variações somaclonais em plântulas somáticas de *C. canephora* conduzidas em campo nas Filipinas e na Tailândia.

Todavia, a espécie arábica parece não apresentar estabilidade genética *in vitro*. Söndahl & Lauritis (1992) estimaram em 10% a variabilidade em plantas micropropagadas e Söndahl & Baumann (2001) registraram que a frequência de variação somaclonal foi genótipo-dependente, com a ocorrência de 3% a 30%, dependendo da variedade. Essa observação foi confirmada por Etienne & Bertrand (2001), que encontraram variação fenotípica de 3% a 10% em 30.000 plantas de 20 clones de híbridos de *C. arabica*.

No presente trabalho, não foram detectadas variações genéticas ou epigenéticas, provavelmente porque a busca por variantes utilizando critérios morfológicos foi realizada em condições de campo. Entretanto, é possível que variantes somaclonais tenham ocorrido durante o cultivo *in vitro* e que esses embriões ou plântulas tenham sido descartados durante o processo de produção de mudas, por não terem formado plântulas normais.

## 6 CONCLUSÕES

Aos dois anos e meio após plantio no campo, plantas provenientes de embriogênese somática apresentam maior diâmetro de copa que plantas provenientes de sementes.

Plantas provenientes de embriogênese somática não apresentam, pela inspeção visual, qualquer alteração no fenótipo para forma, cor, arquitetura de planta, tempo de florescimento e vigor.

O comportamento agrônomico de plantas de *C. arabica* produzidas via embriogênese somática é semelhante ao de plantas oriundas de sementes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic cultura of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion form cotyledonary embryos. **Annals of botany**, v. 90, p.21-29, 2002.

ALBARRAN, J.; BERTRAND, B.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.27-36, 2004.

AMEHA, M. Heterosis in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease. I. First bearing stage. **Acta Horticulture**, v.140, p.155-161, 1983.

ANTUNES FILHO, H.; CARVALHO, A. Melhoria do cafeeiro, ocorrência de lojas vazias em frutos de café Mundo Novo. **Bragantia**, Campinas, v.13, 14, p.165-179, 1957.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Comparison of somatic embriogenesis-derived Coffee (*Coffea arabica* L.) Plantlets Regenerated in vitro or ex vitro: Morphological, Mineral and Water Characteristics. **Annals of Botany**, v.90, p.77-85, 2002.

BERTRAND, B.; ETIENNE, H.; CILAS, C.; CHAQRRIER, A.; BARADAT, P. *Coffea arabica* hybrid performance for yield, fertility and bean weight. **Euphytica**, v. 141, p. 255-262, 2005.

BRAGANÇA, S.M.; CARVALHO, C.H.S. de; FONSECA, A.F.A. da; FERRÃO, R.G. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.765-770, 2001.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.08**, 11 de junho de 2003. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/arquivos/abic\\_nm\\_a1d\\_inst\\_normativa08.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/abic_nm_a1d_inst_normativa08.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2008.

DÍAZ-PÉRES J.C.; SUTTER E.G.; SHACKEL K.A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v.95, p.225-232, 1995.

DUCOS, J.P.; ALENTON, R.; REANO, J.F.; KANCHANOMAI, C.; DESHAYES, A.; PETIARD, V. Agronomic performance of *Coffea*

*canephora* P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium. **Euphytica**, v.131, p.215-223, 2003.

DUCOS, J.P.; PÉTIARD, V. Propagation de clones de Robusta (*Coffea canephora* P.) par embryogenèse somatique en milieu liquide. In: EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. (Ed.). **Biotechnologies végétales: de la structure des génomes à l'Amélioration des Plantes**. Marrakech, Marroco: El Watanya, 2003. p.142-159.

DUCOS, J.P.; LABBE, G.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 6, 2007.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; CÔTE, F.; BERTHOULY, M. L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17., 1997, Montreux. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1997. p.457-465.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiology**, v.21, p.1031-1038, 2001.

ETIENNE-BARRY, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct snowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.111-117, 1999.

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

RYBCZYNSKI, J. Plant regeneration from highly embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of *Trifolium fragiferum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.159-170, 1997.

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

SÖNDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitung Pflanzzüchtung**, v.81, p.395-408, 1977.

SÖNDAHL, M.R.; LAURITIS, J.A. Coffee. In: POR, F.A.; HAMMERSCHLAG, F.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. London: CAB International, 1992. p.401-420.

SÖNDAHL, M.R.; BAUMANN, T.W. Agronomy II: developmental and cell biology. In: CLARKE, R.J.; WITZTHUN O.J. (Ed.). **Coffee: recent developments**. Oxford, UK: Black- well Science, 2001. p.202-220.

VOSSSEN H. van der; WALYARO, D. J. The coffee breeding programme in Kenya: a review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. **Kenya Coffee**, v.46, p.113-130, 1981.

WEBSTER, F.B.; ROBERTS, D.R.; Mc INNIS, S.M.; SUTTON, B.C.S. Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. **Canadian Journal of Forest Research**, v.20, p.1759-1765, 1990.

ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café, Cacao, Thé**, v.35, n.4, p.233-244, 1991.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)