

REGINA CÉLIA FORNI

NÍVEIS DE "MS", BAP, NÚMERO DE GEMAS DO EXPLANTE E PERÍODO DE REPICAGEM NA PRODUÇÃO DE BROTOS, FOLHAS E MATERIA SECA E, NÍVEIS DE 2,4-D E CINETINA PARA TAMANHO E FENÓTIPO DOS CALOS DE **Coffea arabica** L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de «MESTRE».

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS — MINAS GERAIS  
1993

## AGRACEDIMENTO

Será difícil citar toda a gente bonita com quem tive o prazer de conviver durante o período de Lavras. Assim, gostaria de agradecer.

A Escola Superior de Agricultura de Lavras pela oportunidade de participar do curso de Mestrado,

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do curso,

Ao prof. Moacir Pasqual pela amizade, orientação e paciência,

Ao prof. Clauzer de Souza Duarte o meu sincero obrigada,

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho tornar-se realizável, seja por serviços prestados ou ensinamentos, mas principalmente pela atenção, companherismo e amizade,

Em especial às pessoas que aqui convivi mais intimamente, Fafá, Arie, Cicinho, Marquinho e Rejane, Cida, Renatão, e a todos, o meu mais sincero obrigada,

À pessoa que hoje compartilha o caminho ainda por vir, Nei, o meu amor especial,

E finalmente a Deus, sentido de tudo, pelo dom da vida.

DEDICATÓRIA

À pessoa 'mais importante da  
minha vida minha mãe e amiga  
Iara

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE QUADROS .....	xiii
<b>1 . INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 . REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Propagação Vegetativa .....	<b>4</b>
2.2 Propagação Vegetativa "in vitro" .....	<b>5</b>
2.3 Meios de Cultivo ,.....	7
2.4 Reguladores de Crescimento .....	<b>9</b>
2.5 Proliferação de Gemas e Brotos .....	12
2.6 Proliferação de Calos .....	<b>17</b>
<b>3 . MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	20
3.1 Local de Realização e Espécies Vegetais .....	20
3.2 Meio de Cultivo e Recipientes para Inoculação .....	20
3.3 Esterilização e Inoculação do Material .....	21
<b>3.4</b> Preparação dos Explantes .....	21
3.5 Condições de Crescimento .....	22

	Página
3.6 Avaliações e Variáveis Analisadas .....	22
3.6.1 Número total de brotos e folhas .....	22
3.6.2 Numero de brotos maiores que 1cm .....	23
3.6.3 Cor .....	23
3.6.4 Peso da matéria seca .....	23
3.6.5 Tamanho e fenótipo .....	24
3.7 Delineamentos Experimentais e Tratamentos .....	24
3.8 Sistemas de nota para o Experimento 3 .....	25
3.9 Composição do Meio "MS" .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 Experimento 1: Níveis de "MS" x Níveis de BAP .....	27
4.2 Experimento 2: Numero de Gemas x Níveis de BAP ...	39
4.3 Experimento 3: Níveis de cinetina x Níveis de 2,4-D	58
5. CONCLUSÕES .....	65
6. SUGESTOES .....	67
7. RESUMO .....	68
8. SUMMARY .....	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Efeito dos níveis de <b>MS</b> sobre o número total de brotos, em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	29
2 Efeito das doses de BAP dentro de 90 e 120 dias sobre o número total de brotos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	30
3 Efeito dos tempos de análise dentro dos diferentes níveis de BAP sobre o número total de brotos, em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	31
4 Efeito dos níveis de <b>MS</b> sobre o número total de folhas, em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	33

Figura	Página
5 Efeito das doses de BAP dentro de 90 e 120 dias sobre o número total de folhas, em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	34
6 Efeito das doses de BAP dentro de 90 e 120 dias sobre o número total de folhas, em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	35
7 Efeito das doses de BAP sobre o peso da matéria seca em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	38
8 Efeito das doses de BAP sobre o peso da matéria seca em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	38
9 Efeito do número de gemas dentro de 6mg/l de BAP e 120 dias de análise sobre o número total de brotos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	41

## Figura

## Página

- 10 Efeito dos níveis de BAP dentro de 4 e 6 gemas e 120 dias de análise sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 ..... 43
- 11 Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP e explantes com 2 gemas sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 ..... 45
- 12 Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP e explantes com 4 gemas sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 ..... 45
- 13 Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP e explantes com 4 gemas sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 ..... 46

14	Efeito do número de gemas dentro de 6mg/l de BAP e 120 dias de análise sobre o número total de folhas em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 .....	47
15	Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP em explantes com 2 gemas sobre o numero total de folhas em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 .....	49
16	Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP em explantes com 4 gemas sobre o número total de folhas em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 .....	50
17	Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP em explantes com 6 gemas sobre o número total de folhas em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, ,1993 .....	50

Figura	Página
<p><b>18</b> Efeito do número de gemas do explante sobre o número total de brotos maior que 1cm em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44.. ESAL, Lavras - <b>MG</b>, 1993 .....</p>	52
<p><b>19</b> Efeito das doses de BAP sobre o número total de brotos maiores que 1cm em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b>, 1993 .....</p>	53
<p><b>20</b> Efeito do número de gemas do explante sobre a cor em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b>, 1993 .....</p>	54
<p><b>21</b> Efeito das doses de BAP sobre a cor em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b>, 1993 .....</p>	55
<p><b>22</b> Efeito do número de gemas do explante sobre o peso da matéria seca em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b>, 1993</p>	56

Figura	Página
23 Efeito das doses de BAP sobre o peso da matéria seca em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	57
24 Efeito dos níveis de 2,4-D dentro de 25 dias sobre o tamanho dos calos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	60
25 Efeito dos tempos de análise dentro de níveis de 2,4-D sobre o tamanho dos calos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	61
26 Efeito dos tempos de análise sobre o fenótipo dos calos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	63
27 Efeito <b>dos</b> níveis de 2,4-D sobre o fenótipo dos calos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - <b>MG</b> , 1993 .....	64

## LISTA DE QUADROS

Quadro	Página	
1	Resumo da análise de variância sobre o número total de brotos e folhas em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 .....	28
2	Resumo da análise de variância sobre o número de brotos maior que 1cm, cor e peso seco em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 .....	36
3	Resumo da análise de variância sobre número total de brotos e folhas em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993	39
4	Resumo da análise de variância sobre o número de brotos maior que 1cm, cor e peso da matéria seca em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993 .....	51

Quadro	Página
5 <b>Resumo da análise de variância para tamanho e fenótipo dos calos em <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993</b>	58

## 1. INTRODUÇÃO

A origem da palavra café é árabe KAHAWF com raiz turca KAHVEH que é traduzido como "algo que é amargo". Alguns outros dão a tradução de "algo que estimula". Todas as duas **são** perfeitas em descrever a relação entre o sabor amargo e **os** seus efeitos gustativos e estimulantes (CEBALHOS, 1974).

Devido à grande popularidade da bebida, seu cultivo foi expandido pelo mundo **no** século XVIII e XIX e, nos dias atuais, o café é a cultura permanente mais difundida em regiões tropicais onde a metade da área total cultivada encontra-se na América Latina sendo importantes países produtores o Brasil, a Colômbia, México, Guatemala e Costa Rica.

Apesar da profunda crise econômica sofrida pela cultura nos últimos anos, o café ainda é considerado um dos produtos agrícolas mais importantes do mundo. Os países produtores, na sua quase totalidade, pertencentes à classe dos países Subdesenvolvidos ou em desenvolvimento **são** também **os** exportadores do produto gerando divisas e influenciando significativamente a sua economia.

Existem duas espécies comercialmente importantes: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre - Robusta. Por sua

bebida de qualidade superior, cerca de 70% dos plantios comerciais mundiais *são* de *Coffea arabica*. **No** Brasil, a predominância das plantações de *C. arabica* também é marcante, com destaque para *os* estados de Minas Gerais e **São** Paulo, sendo *o* Sul de Minas e a Mogiana Paulista as regiões que, tradicionalmente, produzem *o* café de melhor qualidade no país. *O Coffea canephora* é usualmente cultivado em regiões tropicais de baixa altitude, onde se destaca *o* estado do Espírito Santo como sendo *o* principal representante produtor dos cafés da espécie *Coffea canephora*.

A multiplicação "in vitro" já é considerada de grande importância para a propagação em larga escala de genótipos excepcionais obtidos pelo melhoramento genético ou mesmo de variações induzidas "in vitro", cuja fixação, por via sexual, seria muito longa e cara.

**As** pesquisas sobre a multiplicação vegetativa "in vitro" de plantas de interesse econômico *são* cada vez mais numerosas. O café é uma dessas plantas, devido **ao** seu grande interesse, principalmente para *os* países exportadores.

**As** técnicas de cultura, de tecidos têm possibilitado além da obtenção de um grande número de plantas, a diminuição do tempo necessário para obtenção de novas progênes e a garantia da Uniformidade genética do material.

**Os** trabalhos pioneiros com café, em cultura de tecidos, foram publicados por Staritsky (1970) que teve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *C. canephora*. Depois disso, muitos

trabalhos foram realizados em diferentes países usando métodos e espécies diversos.

Neste trabalho, os objetivos foram:

Determinar a melhor combinação entre as diferentes concentrações de BAP e tamanho do explante;

Determinar a melhor concentração de BAP em interação com diferentes proporções dos sais inorgânicos e componentes orgânicos do meio "MS" na produção de brotos e folhas, brotos maiores que 1cm e, peso da matéria seca;

Determinar a melhor combinação entre diferentes níveis de cinetina e 2,4-D para tamanho e fenótipo dos calos;

Determinar o melhor período de tempo para a produção de brotos e folhas:

Determinar o melhor período de tempo para obtenção de calos de maior tamanho e melhor fenótipo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Propagação Vegetativa

As duas espécies mais importantes, *C. arabica* e *C. canephora*, são tradicionalmente propagadas via semente. O *C. arabica* é uma planta autógama e assim as progêneses são mais uniformes, enquanto que no *C. canephora*, alógama, as progêneses são altamente heterogêneas. Genótipos favoráveis podem ser obtidos por via assexual e, no caso do *C. canephora*, é possível propagar plantas idênticas a matrizes excepcionais (SONDAHL et alii, 1981).

A planta de *C. arabica* forma-se normalmente de um só ramo central. Em seu ápice há uma zona de crescimento ativo durante toda a vida da planta que vai alargando o ramo central formando-se nós e entre-nós (LEON, 1968).

Os cafeeiros caracterizam-se por ter uma grande especialização de seus ramos. Os ramos ortotrópicos, responsáveis pelo crescimento em altura, dão origem a outros ramos ortotrópicos e, a ramos plagiotrópicos que possuem a capacidade única de produzir novos ramos plagiotrópicos. Este dimorfismo caulinar caracteriza-se por uma diferenciação somática de

natureza permanente e suscetível de ser propagada vegetativamente (ANDRE, 1383).

Devido a estas características vegetativas, próprias da planta, a multiplicação assexual pelos métodos tradicionais deve se restringir à utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, onde o número é sempre limitado para um clone novamente selecionado (DUBLIN, 1984).

## 2.2. Propagação Vegetativa "in vitro"

Toda técnica que permita aumentar desde o início a taxa de multiplicação, manter as características genéticas e acelerar a instalação de determinada cultura em viveiros, apresenta um interesse real para o melhoramento genético destas plantas (DUBLIN, 1980b).

Hoje em dia, há a necessidade de cafés com alta qualidade no mercado mundial, mas no todo, os países produtores de café têm dado ênfase para aumento de produção e não para qualidade. As técnicas de cultura de tecidos podem ser muito usadas para propagar híbridos interespecíficos estéreis e produção de plantas matrizes superiores (SONDAHL et alii, 1984).

A multiplicação vegetativa indica a reprodução rápida "in vitro" de variedades, espécies, ao mesmo tempo que se respeita seu patrimônio genético, e portanto, suas características biológicas, fisiológicas, agrônomicas e tecnológicas (GUZMAN & BERTHOULY, 1987).

Uma razão porque a metodologia de cultura de tecidos de plantas não tem sido usada extensivamente para a propagação de plantas é que algumas plantas não apresentam capacidade de regeneração. Outro requerimento para a utilização da cultura de tecidos é o período de crescimento desorganizado que deve ser o menor possível a fim de minimizar as possibilidades de mudanças genéticas na fase de calos. Embora os requerimentos básicos para o crescimento de células de plantas e tecidos em culturas estejam bem estabelecidos, há um fundamental problema de como manipular o ambiente para provocar a regeneração integral das plantas (COCKING & RILEY, 1981).

A cultura do café apresenta inúmeras variedades que podem sofrer segregação, pois muitas vezes, não estão estabilizadas. Pode-se, através da micropropagação, formar clones e evitar este problema (PASQUAL & PINTO, 1988).

As pesquisas sobre a propagação "in vitro" dos cafeeiros são mais recentes e menos numerosas que as realizadas sobre embriogênese somática. Elas se referem às mesmas espécies: arábica, robusta e arabusta (DUBLIN, 1980a).

A propagação vegetativa por cultura de brotos axilares tem sido demonstrada com o gênero *Coffea*. Cálculos teóricos com modelos da cultura de *C. arabica* sugerem uma capacidade de cerca de 13.000 brotos/nó após 15 meses de cultivo contínuo (MEDINA et al, 1983).

Pode-se obter rapidamente brotos vigorosos utilizando explantes com dois nós, que são horizontalmente colocados no meio de cultura (DUBLIN, 1984).

Segundo BAUMANN & NEUENSCHWANDER (1990), exceto as raízes, todas as outras partes da planta de café têm sido utilizadas no cultivo "in vitro".

As folhas apresentam-se como material abundante para ser usado como explante, sempre disponível e de fácil remoção. Possuem também taxas de infecção sempre menores quando comparadas **as** taxas de fragmentos de hastes (DUBLIN, 1981).

Para a micropropagação, o explante terá um par de folhas reduzidas à metade e um fragmento de entrenó. **Os** melhores explantes **são** fragmentos de talos ortotrópicos com gemas pré-existentes (DUBLIN, 1991).

A posição vertical sobre o meio favorece o número de gemas formadas. A propagação "in vitro" a partir de brotos ortotrópicos existentes é praticamente irrealizável em razão das enormes dificuldades de desinfecção desses brotos (DUBLIN, 1980b).

### **2.3. Meios de Cultivo**

Na cultura "in vitro", células, tecidos ou órgãos **são** isolados do organismo e cultivados em condições assépticas, num meio de cultura cuja composição física e química é perfeitamente conhecida. Estas culturas **são** tratadas adequadamente através de um balanço nutricional e hormonal, estabelecendo-se condições ambientais bem controladas (BANDEL et alii, 1975).

A composição variável da mistura dos componentes do meio constitui o segredo do êxito da iniciação e do

desenvolvimento da organogênese até a obtenção de microplântulas (CAMBRONY & SNOECK, 1983).

Desde 1962, a maioria dos pesquisadores usam o meio de MURASHIGE & SKOOG - "MS"- ou seus derivados, "SH" e "B5". A maior diferença destes meios está na quantia e forma de N e nas quantidades relativas de alguns macroelementos (THORPE & PATEL, 1984).

Os meios de cultura *são* normalmente constituídos dos seguintes componentes:

**Macroelementos:** os primeiros meios foram baseados na solução para cultivo hidropônico de Knopp(1965) (GUEVARA, 1987a). Os macroelementos mais favoráveis à formação de brotos em Rubiaceae *são os* do meio 30K de Margara (DUBLIN, 1980b).

**Microelementos:** Os micronutrientes do meio "MS" incluem todos aqueles elementos minerais aceitos atualmente como essenciais para as plantas clorofiladas (CALDAS et alii, 1990).

**Carboidratos:** para a formação de brotos em Rubiaceae há um aumento da taxa de formação com o aumento da concentração de açúcar até um limite de 50mg/l. Em torno de 30mg/l há um desenvolvimento de calos cicatrizados de onde emergem os brotos neoformados (DUBLIN, 1980b).

**Aminoácidos:** A caseína hidrolizada é uma das fontes mais comuns de se adicionar aminoácidos ao meio (GUEVARA, 1987a). A adenina, extrato de malte e glutamina possuem ação favorável à neoformação de brotos, enquanto que a glicina possui ação desfavorável (DUBLIN, 1980b).

**Mioinositol:** embora seja uma substância do tipo **carboidrato**, com **frequência** é considerado uma vitamina. Não é indispensável, mas quando adicionado ao meio, estimula o Crescimento (GUEVARA, 1987a).

Em tabaco, a omissão desta vitamina diminui em 50% a produção de brotos na primeira repicagem e 30% na segunda. Também está claramente confirmado que o mioinositol aumenta a resposta de tiamina (LINSMAIER & SKOOG, 1965).

#### 2.4. Reguladores de Crescimento

**As** culturas de órgãos e tecidos dos cafeeiros nos tem permitido entrever o papel do equilíbrio hormonal na orientação da organogênese. **As** modificações induzidas no equilíbrio dos constituintes hormonais do substrato de base, por ocasião do preparo das culturas "in vitro" podem bem representar o que se passa, de fato, na natureza por ocasião das variações mensuráveis dos balanços hormonais endógenos dos vegetais. Os teores flutuantes entre auxinas e citocininas, determinam o desenvolvimento preponderante em brotos, raízes ou calos, submetidos posteriormente, à manipulação (CAMBRONY & SNOECK, 1983).

Um meio mínimo sem a adição de hormônios raramente Serve de veículo para suportar um crescimento de tecidos normais. Substâncias estimulantes de crescimento podem ser supridas na forma de fluidos naturais, como água de coco, que **são** conhecidas

por conter auxinas, citocininas, giberelinas e açúcares-álcool, como o mioinositol (**KRIKORIAN** et alii, 1987).

Certos compostos como a sacarose e as citocininas determinam o efeito positivo na neoformação de gemas. A porcentagem de gemas por explante aumenta com maiores concentrações de citocinina e sacarose no meio de cultivo (**DUBLIN**, 1991).

Auxina é o termo que se aplica ao grupo de compostos caracterizados por sua 'capacidade de induzir o alongamento das células. A ação sobre o crescimento celular dá-se pelo estímulo do crescimento de brotos e folhas, mas em concentrações diferentes, sendo as mais altas para os brotos. Segundo a concentração há a inibição ou o estímulo do desenvolvimento de gemas. A nível celular, as auxinas induzem o aumento da plasticidade parietal (**GUEVARA**, 1987b).

As auxinas diferem significativamente em estabilidade, eficácia e na sua influência sobre a organogênese (**MURASHIGE**, 1974).

São amplamente usadas na micropropagação promovendo o crescimento de calos e regulando a morfogênese, especialmente em associação com citocininas. Altos níveis de auxinas induzem a formação de embriões, mas uma vez iniciado o processo, estes somente desenvolvem-se em baixas concentrações de auxinas. As auxinas sintéticas colocadas em meio de cultura podem ser absorvidas por sitios de fixação nos tecidos e serem liberadas só muito depois (**GUEVARA**, 1987b).

Na cultura de tecidos, as **citocininas** têm sido mostradas por causar início de brotação em muitas plantas. Há também evidências que as citocininas possuem **importância** fisiológica. Não **só** causam brotação como também liberam brotos que estão inibidos (SACHS & THIMANN, 1967).

A citocinina no meio de cultura é indispensável para para a indução e desenvolvimento de gemas neoformadas. A Benzilaminopurina (BAP) em concentrações compreendidas entre 1 e 10mg/l, mostrou-se eficiente para multiplicar o híbrido interespecífico Arabusta, resultado do cruzamento de *C. arabica* com *C. canephora* (DUBLIN, 1980b). Cinetina. e BAP **são** aproximadamente equivalentes em eficácia. A concentração de citocinina necessária no meio para cultura de tecidos pode ser superior a 30mg/l (MURASHIGE, 1974).

A maioria dos explantes "in vitro" não sintetiza citocininas suficientes para permitir um crescimento contínuo. Em altas concentrações as citocininas podem inibir o desenvolvimento de raízes o BAP é uma citocinina que estimula a proliferação de gemas axilares (GUEVARA, 1987b).

Entre as citocininas, o BAP e o IPA - isopentenil adenina - **são** mais eficazes que a cinetina na ação indutora de brotos. Concentrações superiores a 1mg/l traduz-se por um aumento notável do número de brotos por explante (DUBLIN, 1980b).

## 2.5. Proliferação **de Gemas e Brotos**

Os trabalhos pioneiros com microestaças visando a micropropagação do cafeeiro foram feitos por CUSTER et alii, (1980) partindo de fragmentos de brotos ortotrópicos e plagiotrópicos de *C. arabica*. O estabelecimento "in vitro" foi relativamente difícil. Por outro lado, os autores comprovaram que brotos obtidos de gemas plagiotrópicas e desenvolvidos "in vitro" apresentavam um porte vertical, comparável aos daqueles obtidos de gemas ortotrópicas, sob as mesmas condições (DUBLIN, 1991).

A partir daí, vários trabalhos foram realizados visando a produção de gemas e brotos. CUSTER et alii (1980), na tentativa de propagar o cafeeiro *C. arabica* "in vitro", a partir de segmentos nodais, registraram uma baixa taxa de multiplicação (2,2 novos brotos/explante) usando meio "MS", acrescido de BAP 9,9mg/l e AIA 0,1mg/l.

Os mesmos autores, trabalhando com segmentos nodais e diversas citocininas (entre elas o BAP), para o desenvolvimento de gemas axilares, obtiveram melhor resultado após 7 semanas de cultivo com 10mg/l de BAP, conseguindo em média, 2,8 gemas/nó. As outras citocininas não foram tão satisfatórias como o BAP.

CROCOMO et alii (1975) observaram o desenvolvimento de brotos em alguns explantes, subcultivados de crescimento de explantes de brotações ortotrópicas no meio de Staritsky (1970), suplementado com caseína hidrolizada, vitaminas de White (1963) e 0,05mg/l de cinetina quando trabalhavam na obtenção de calos.

Cultivos de entrenós em meio "30K" e "MS" (MURASHIG & SKOOG, 1962), suplementados com 10mg/l de IPA, BAP ou AIA proporcionaram em Arabusta, Arábica e Robusta, taxas de neoformação de brotos na ordem de 30 a 57% (DUBLIN, 1980b), valores considerados baixos em relação a outras espécies.

Utilizando-se, como explantes, segmentos nodais de Arabusta em meio "MS", suplementado com extrato de malte 400mg/l e BAP 9,68mg/l, o autor conseguiu resultados semelhantes aos de Custer (1980), ou seja, uma baixa taxa de multiplicação, cerca de 2,5 novos brotos/explante.

SONDAHL & NAKAMURA (1980), cultivando nós ortotrópicos e plagiotrópicos de Mundo Novo com meio "MS", acrescido de tiamina 10mg/l, piridoxina 3,08mg/l, ácido nicotínico 3,69mg/l, inositol 100mg/l, cisteína 24,24mg/l, sacarose 20g/l, 6-BA 11,25mg/l, e AIA 0,1mg/l, ágar 10g/l, obtiveram resposta de 44% dos nós cultivados, com desenvolvimento médio de 1,33 gemas/nó após 20 dias de inoculação. Neste experimento, os autores observaram que os ramos plagiotrópicos não apresentaram crescimento de gemas.

Repetindo o trabalho anterior, apenas alterando a Concentração de ágar para 8g/l, NAKAMURA & SONDAHL (1981) obtiveram, em média, 4,4 plântulas/nó.

SONDAHL et alii (1981) trabalhando com explantes nodais em meio "MS" acrescido de 6-BA 9,9mg/l, e AIA 0,1mg/l da mesma forma que CUSTER (1980), obtiveram os mesmos resultados, conseguindo o desenvolvimento de 2,2 novos brotos/nó, após 5

Semanas de inoculação. O desenvolvimento foi observado num meio suplementado com extrato de malte 400mg/l e 6-BA.

Novamente NAKAMURA & SONDAHL (1983) usando '50% da concentração dos sais inorgânicos e vitaminas completas de "B-5", inositol, cisteína, BAP 11,25mg/l e AIA 1,75mg/l, carvão ativado 5g/l, PVP 1g/l e ágar, obtiveram o desenvolvimento de gemas dormentes nas axilas foliares e subsequente recuperação de plântulas derivadas das gemas (em média, 1,5 plântula/nó no café Icatu, 1,6 plântula/nó no Mundo Novo e 1,7 plântulas/nó no Catuaí). Observaram ainda, uma maior eficiência do BAP na indução e crescimento de gemas.

Em *Coffea arabica*, SONDAHL et alii (1991) têm observado que a adição de carvão ativado (0,01 a 2% grau G60) não possui efeito sobre o crescimento e desenvolvimento de explantes.

Em uma etapa primária, na obtenção de brotos ortotrópicos, DUBLIN (1984) utilizou-se do meio com sais de "MS" ou Margara "30K", contendo vitaminas de Morel, cisteína 30mg/l, BAP 1 a 5mg/l, sacarose 30 a 40g/l e ágar 6 a 7g/l com pH ajustado a 5,6 antes da autoclavagem. Observou também que as taxas de neoformação e o número de mudas neoformadas/explante aumentavam regularmente com o incremento de citocininas no meio de cultura.

SONDAHL et alii (1984), cultivando nós de café em meio "MS" acrescido de 9,91mg/l de BAP asseguraram ter obtido um desenvolvimento médio de 2,2 gemas/nó. Quando cultivaram brotos

plagiotrópicos num meio contendo 25% da concentração dos sais de "MS, AIA 0,1mg/l e BAP 5,63mg/l, após cerca de 43 dias de inoculação, observaram a formação de um par de folhas/broto no zafé Catuaí, enquanto que para o Mundo Novo, esta formação foi de 0,4 par de folhas/broto.

SONDAHL E LOH (1987), relataram que em cultura de nós de cafeeiros deve-se usar um meio primário por 50 a 60 dias contendo MS com 25% da concentração dos sais inorgânicos, AIA 0,5 µM, BAP 25µM, carvão ativado 5g/l e sacarose 0,03M. Os autores relatam que o número de brotos é parcialmente controlado pelo nível de citocinina, porém níveis muito elevados podem induzir mudanças de ordem fisiológica e bioquímica, levando à baixa frequência de enraizamento.

BERTHOLY & ECHEVERRY (1987), trabalhando com diferentes linhagens de Catimor, em meio "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962); várias concentrações de sacarose, pH entre 4,6 a 5,6, ácido ascórbico e BAP, afirmaram obter novas brotações/explante inicial (7 a 9 micronós) após 80 dias de inoculação, uma vez estabelecidos os explantes.

BARROS & PASQUAL (1989a), usando explantes de Catuaí em meio "MS", contendo vitaminas de Morel, mioinositol 1mg/l, glicina 2g/l, sacarose 30g/l e ágar 7g/l, com a concentração de BAP variando de 0 a 4mg/l na ausência e na presença de ANA 0,2mg/l, obtiveram a melhor proliferação de gemas e brotos menores que 1cm com 3,0mg/l de BAP, após 90 dias de inoculação. Para brotos maiores que 1cm, a concentração de BAP foi de 0,5 a

1mg/l. OS autores ainda afirmam que a presença de ANA é prejudicial à proliferação de brotos.

Num outro trabalho, BARROS & PASQUAL (1989b), obtiveram uma proliferação média de 4 brotos/explante inicial com o meio "MS" acrescido de 3mg/l de 6-BA, após 90 dias da inoculação.

Ainda BARROS & PASQUAL (1990), trabalhando com as concentrações de 0 a 6mg/l de BAP e de 0 a 10mg/l de GA<sub>3</sub>, e meio "MS", observaram que o número total de brotos aumenta com o aumento de BAP e diminui com o aumento de GA<sub>3</sub>. A maior porcentagem de brotos aptos para o enraizamento foi obtida com 1,5mg/l de BAP e 10,0mg/l de GA<sub>3</sub>.

SONDAHL et alii (1991) cultivando nós de *Coffea arabica* para a proliferação de gemas e brotos no meio "B-5" modificado, contendo BAP 5,63 a 11,26mg/l e AIA 1,75mg/l, observaram que o número de gemas desenvolvido por nó é parcialmente controlado pelo nível de citocinina. Níveis mais altos induzem a um maior desenvolvimento do número de gemas, mas podem trazer efeitos adversos no crescimento posterior dos brotos. O BAP tem se mostrado mais eficiente que a cinetina tanto a 5.63mg/l (2,1 contra 1,2 gemas/nó) como a 11,26mg/l (2,3 contra 1,4).

Afirmam também os autores que o uso de ANA 0,2mg/l em completa escuridão promove um bom estabelecimento de brotos jovens de café e que o número de brotos produzidos variará Segundo o número e tamanho de explantes utilizados e também conforme a eficiência do estabelecimento dos cultivos.

ZOK & DUBLIN (1991) afirmam que o desenvolvimento de brotos aumenta com o aumento das citocininas até uma dose limite de BAP e cinetina de 10mg/l, sendo que, acima disso há uma ligeira inibição. As concentrações mais eficientes são de BAP 5mg/l e cinetina 10mg/l.

## 2.6. Proliferação de *Calos*

STARITSKY (1970), trabalhando brotações ortotrópicas de três espécies de *Coffea* em meio contendo sais inorgânicos de LINSMAYER & SKOOG (1965), sacarose 30g/l, tiamina 1mg/l, cisteína 10mg/l, mioinositol 100mg/l cinetina 0,1mg/l e 2,4-D 0,1mg/l ou ANA 1mg/l, obteve rápida proliferação de calos nas espécies de *C. arabica* e, embriões e plântulas de *C. canephora*. Os calos apresentavam dois fenótipos: branco com aparência esponjosa e células mais alongadas e outro mais compacto, com células mais redondas.

SHARP et alii (1973), usando *C. arabica* cv. Mundo Novo e Bourbon Amarelo e diferentes tipos de explantes, com meio semelhante ao de Staritsky, acrescido de leite de coco a, 5%, observaram um desenvolvimento de calos precoce para altas concentrações de auxinas - 4 ou 8mg/l de 2,4-D.

Por outro lado, CARVALHO et alii (1974), observaram que aumentando a concentração de sacarose para 40g/l e caseína 2g/l, com 0,1mg/l de cinetina e 2,4-D encontraram calos no 13º dia, quando incubados no escuro a 24°C. HERMAN & HASS (1975) também

utilizando o mesmo meio e 0,1mg/l de cinetina e 0,1mg/l de 2,4-D observaram baixo crescimento de calos.

BANDEL et alii (1975) verificaram 5 fenótipos de calos diferentes usando o meio de STARITSKY (1970), cinetina e 2,4-D em concentrações entre 0 a 0,25mg/l. Enquanto CARVALHO et alii (1976) obtiveram os mesmos resultados com o meio de LINSMAIER & SKOOG (1965), acrescido de caseína hidrolizada 2g/l, cisteína 50mg/l, tiamina 4mg/l e sacarose 40mg/l.

SONDAHL & SHARP (1977a) afirmam que um mínimo de 0,11mg/l de cinetina e 0,22mg/l de 2,4-D são essenciais para iniciar o processo e que a proliferação ótima ocorre com 2mg/l de 2,4-D e 3,87mg/l de cinetina. Os mesmos autores (1977b) também relatam que cinetina, em combinação com 2,4-D ou ANA foi mais efetivo que AIA ou IBA na proliferação de calos. Ainda SONDAHL et alii (1979) indicam para a indução de calos, uma solução salina com metade das concentrações de "MS", acrescida de 30% de sacarose como um pré-tratamento. Os explantes que se mantiverem verdes, devem passar para o meio usado por SONDAHL & SHARP (1977b) por 6 semanas no escuro.

Há uma suscetibilidade dos tecidos de calos subcultivados às mudanças de temperatura, tanto baixas, que paralizam o crescimento e estimulam a oxidação, como para altas, que matam os tecidos das plântulas (FERREIRA, 1979).

Segundo SONDAHL (1978), o 2,4-D foi a auxina mais efetiva na promoção da proliferação celular, com a necessidade de uma concentração mínima de citocinina (cinetina 0,5µM) junto com as auxinas para o início do processo. Estudando Catuaí, relata

que a relação ideal exigida para o calejamento é de 1:5 (cinetina/2,4-D).

DUBLIN (1980a) afirma que, em presença de 2,4-D 0,1mg/l, os calos rapidamente tornam-se friáveis e esponjosos; o ANA conduz a calos de crescimento rápido, mas com taxas de sobrevivência muito baixas, passando para pardos e indo rapidamente para marrom.

NASSUTH et alii (1980) observaram a emergência de células de calos a partir de 9 a 10 dias após a inoculação usando meio "MS", tiamina 1mg/l, cisteína 10mg/l, glicina 2mg/l, adenina 1mg/l, caseína hidrolizada 100mg/l, 30g/l de sacarose, IBA 5mg/l e BAP 1mg/l.

Calos foram produzidos no escuro em 4 a 6 semanas, por DUBLIN (1981) quando usou folhas de Arabusta como explante e meio "MS", vitaminas de Morel, 30 a 40g/l de sacarose, adenina 40mg/l e extrato de malte 400 a 500mg/l e 2,4-D entre 0,01 a 1,0mg/l.

Usando o meio básico de STARITSKY (1970) com diferentes concentrações de 2,4-D, LONDOÑO et alii (1981) obtiveram crescimento ótimo de calos incubados no escuro por 7 semanas, com altos índices de 2,4-D.

A concentração ótima para a indução e crescimento de calos para *Coffea arabica* está entre 0,4 a 1,0mg/l de 2,4-D e 0,43 a 0,99mg/l de cinetina, ou 4,5mg/l de BAP e 0,22mg/l de 2,4-D, segundo SONDAHL et alii (1981).

YASUDA et alii (1985) usaram meio "MS" com várias combinações de BAP e ANA. 1,13mg/l de BAP produziram calos brancos friáveis após 16 semanas da inoculação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Local de Realização e Espécies Vegetais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, na cidade de Lavras, **MG**. O período de execução da fase de laboratório foi de outubro /91 a junho/92.

O material vegetal utilizado foi o *Coffea arabica* L.: cv. Catuaí vermelho CH 2077-2-5-44, cujas plântulas já **se** encontravam estabelecidas "in vitro" com cerca de seis meses de idade e aproximadamente 4 ou 6 pares de folhas/broto.

#### 3.2. Meio de Cultura e Recipientes para a Inoculação

O meio de cultura básico foi o "**MS**" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e o agente gelificante foi o ágar, na proporção de 7g/l. O pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. Para a indução de calos **os** sais de "**MS**" foram usados na metade da concentração e **os** outros componentes usados integralmente, acrescido de 2g/l de caseína hidrolizada.

Foram usados frascos tipo azeitona, com capacidade para 200ml, fechados com tampas plásticas sem rosca. Cada frasco foi preenchido com um volume de 40ml de meio. Para o trabalho com calos, foram usados tubos de ensaio fechados com tampas plásticas contendo 10ml de meio e deixados inclinados para solidificar.

### **3.3. Esterilização e Inoculação do Material**

O material para a inoculação, separação e preparo dos explantes - bisturis, lâminas, pinças - durante os trabalhos foram colocados em tubos de ensaio contendo álcool 70% mais o bactericida Quemicetina. Placas de Petri com papel filtro foram usadas para a execução do trabalho.

Para a esterilização dos meios e do material de inoculação usou-se uma autoclave de vapor úmido com 121°C de temperatura e 1 atm de pressão por 20 minutos. O material de inoculação, após a autoclavagem, foi levado para a estufa por 24 horas.

Os trabalhos de inoculação e transferência foram realizados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, contendo luz ultra-violeta para esterilização e ligadas e limpas com álcool 90%, 2 horas antes do início dos trabalhos.

### **3.4. Preparação dos Explantes**

Os explantes foram retirados de plântulas isentas de contaminantes, separados sobre Placas de Petri, desprezando-se

sempre as folhas e a gema apical contendo um par de gemas no experimento 1 e, um, dois e três pares no experimento 2, inoculados verticalmente no meio. Para o experimento com calos, os explantes foram as folhas, cortadas ao meio e utilizando-se sempre a metade superior da folha, com a parte ferida sendo exposta ao meio de cultura.

### 3.5. Condições de Crescimento

Após a montagem dos experimentos, os mesmos foram conduzidos em sala de crescimento, fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de  $30 \mu\text{Mol de quanta/m}^2/\text{s}$ , temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de cerca de 26%. Para a indução de calos, o experimento foi conduzido sob escuro total e temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 3.6. Avaliações e Variáveis Analisadas

#### 3.6.1. Número total de brotos e folhas

Para os experimentos 1 e 2, foram feitas avaliações Visuais aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação. Na avaliação final, realizada aos 120 dias após a inoculação, fez-se a separação individual de brotos e folhas com posterior contagem de brotos e folhas.

### 3.6.2. Número de brotos maiores que 1cm

Para **os** experimento 1 e 2, aos 120 dias após a inoculação, na avaliação final, depois de separados individualmente, foram medidos **os** tamanhos dos brotos fazendo-se a contagem de brotos maiores que 1cm e brotos menores que 1cm.

### 3.6.3. Cor

A cor dos explantes foi observada e classificada em **três** categorias. Explantes que continham coloração verde claro **ou** amarelado recebiam nota 1; explantes com coloração normal, nota 2; e explantes com verde intenso, nota 3.

### 3.6.4. Peso da matéria seca

Para **os** experimentos 1 e 2, após a contagem do número de brotos, folhas e brotos maiores que 1cm, e observação da cor, na avaliação final, **o** material vegetal de cada parcela foi recolhido em sacos de papel previamente identificados e levados à estufa por 36h. **O** material seco foi registrado em mg/frasco e depois obteve-se a média para cada explante, dividindo-se **o** peso obtido pelo número de explantes contidos no frasco (4).

### 3.6.5 Tamanho e Fenótipo

para o experimento 3, os parâmetros avaliados foram tamanho e fenótipo dos calos e as avaliações foram feitas por um sistema de notas e realizadas semanalmente. Para fins de análises estatísticas, foram selecionadas quatro épocas (25, 50, 100 e 120 dias).

### 3.7 . Delineamentos Experimentais e Tratamentos

Nos experimentos 1 e 2 ,o delineamento experimental foi o Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial, para as variáveis número de brotos maiores que 1cm, cor e peso da matéria seca. Para as variáveis número total de brotos e número total de folhas, usou-se a Parcela Subdividida no Tempo.

No experimento 3, o delineamento experimental utilizado foi a Parcela Subdividida no Tempo, em esquema fatorial.

No experimento 1, foram combinados quatro níveis de concentrações dos componentes do meio "MS" (25%, 50%, 75% e 100%) e quatro níveis de BAP (0,0; 3,0; 6,0 e 9,0mg/l). O experimento, em esquema fatorial 4x4, contava com quatro repetições. Cada Parcela era constituída de um frasco e, cada frasco continha 4 explantes.

No experimento 2, foram testados quatro níveis de BAP (0,0; 3,0; 6,0 e 9,0g/l) em combinação com três tamanhos de explantes, sendo que os explantes continham um, dois e três pares de gemas. O experimento, em esquema fatorial 4x3 contava com

cinco repetições. Cada parcela era constituída de um frasco e, cada frasco continha 4 explantes.

No experimento 3, foram testados três níveis de 2,4-D (0,1; 1,0 e 10,0mg/l) em combinação com quatro níveis de cinetina (0,01; 0,1; 1,0 e 10,0mg/l). O experimento, em esquema fatorial 3x4 contava com cinco repetições. Cada parcela continha quatro tubos e cada tubo continha apenas um explante:

### 3.8. Sistema de Notas para o Experimento 3

Sistema de notas para fenótipo:

- 1/= totalmente oxidado - preto ou marrom bem escuro
- 2/= oxidado com alguns pontos sem oxidação
- 3/= sujo friável
- 4/= branco **sujo**
- 5/= branco cremoso
- 6/= branco neve

Sistema de notas para tamanho:

- 1/= sem formação de calos
- 2/= muito pequenos - 0,06 a 0,2cm<sup>2</sup>
- 3/= pequenos - 0,2 a 1,0cm<sup>2</sup>
- 4/= médios - 1,0 a 2,0cm<sup>2</sup>
- 5/= grandes - 2,0 a 4,0cm<sup>2</sup>
- 6/= muito grandes - calos maiores que 4,0cm<sup>2</sup>.

Os resultados relativos a contagem foram inicialmente transformados, para posteriores análises estatísticas.

## 3.9. Composição do Meio "MS"

## MEIO "MS"

Componentes:	Concentrações
-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00 mg/l
-KNO <sub>3</sub>	1900,00 mg/l
-CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440,00 mg/l
-MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370,00 mg/l
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00 mg/l
-MnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	22,30 mg/l
-ZnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	8,60 mg/l
-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20 mg/l
-KI	0,83 mg/l
-NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
-CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
-CuCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
-Na <sub>2</sub> EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	37,30 mg/l
-FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,80 mg/l
-glicina	2,00 mg/l
-ácido nicotínico	0,50 mg/l
-piridoxina	0,50 mg/l
-tiamina	0,10 mg/l
-mioinositol	100,00 mg/l
-sacarose	30.000,00 mg/l

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento 1: Níveis de "MS" x Níveis de BAP

Observa-se pelo Quadro 1 que houve efeito do BAP sobre o número de brotos, o mesmo ocorrendo com os níveis de "MS".

A interação principal estudada não apresentou significância para o nível de probabilidade estudado (5%), enquanto que para tempo, fator secundário, houve interação para os níveis de BAP.

Os explantes cultivados em meio contendo água mais ágar ("MS"0%) mais os diferentes níveis de BAP, foi suprimindo das análises por não haver nenhuma sobrevivência dos explantes, embora tenham permanecidos verdes durante o período compreendido na primeira avaliação (30 dias), porém sem nenhum broto. Nas avaliações seguintes, os explantes apresentavam-se totalmente oxidados, sem condição alguma de produzir novos brotos.

Observa-se pela Figura 1, que para o número total de brotos, o meio "MS" usado integralmente é o que apresentou os melhores resultados, resultados estes também obtidos por SONDAHL & NAKAMURA (1980) cultivando nós ortotrópicos de Mundo Novo. Num outro trabalho utilizando-se também o "MS" integralmente, SONDAHL

et alii (1981) conseguiram, em café, o desenvolvimento de 2,2 brotos/nó.

QUADRO 1. Resumo da análise de variância sobre o número total de brotos e folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

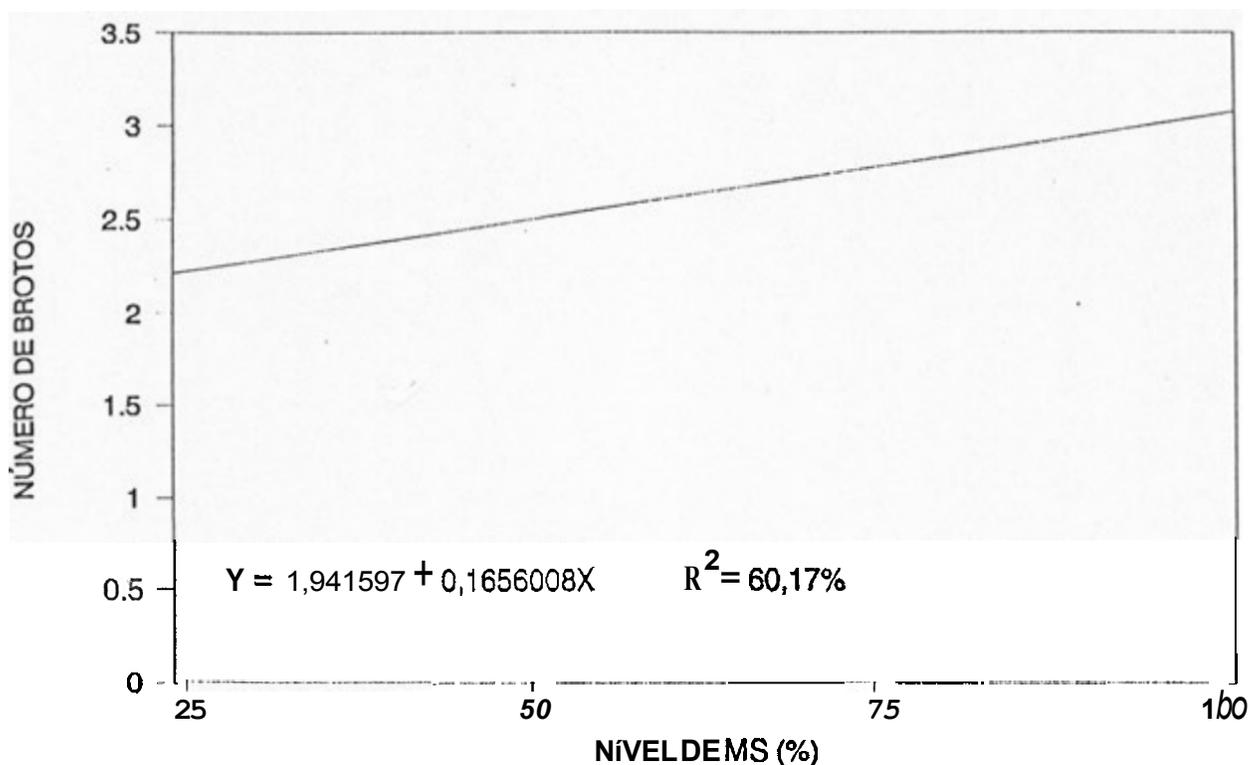
Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios	
		Número Brotos	Número Folhas
BAP	3	0,96132**	4,8748569**
MS	3	0,30384*	2,1215227**
BAP x MS	9	0,14365	0,9110450
Erro (A)	48	0,08613	0,5234032
C.V. (%)		7,175	13,76
Tempo	3	0,82777**	8,1967736**
BAP x Tempo	9	0,20955**	0,7452037**
MS x Tempo	9	0,02913	0,1448963
BAP x MS x Tempo	27	0,01500	0,0840244
Erro (B)	144	0,02230	0,1117772
C.V. (%)		7,302	

A correlação positiva indica que houve Proporcionalidade entre os valores, ou seja, à medida que se aumentou os níveis de "MS", aumentou-se o número de brotos Produzidos.

Como a interação BAP x Tempo foi significativa, houve a necessidade de desdobramentos.

Estudando-se os níveis de BAP dentro de tempo, observou-se que não houve diferenças significativas entre os níveis usados, quando as análises foram feitas aos 30 dias, o

mesmo acontecendo para as análises de 60 dias. Então pode-se afirmar que o número de brotos produzidos não sofreu influência dos níveis de **BAP** até 60 dias da inoculação.

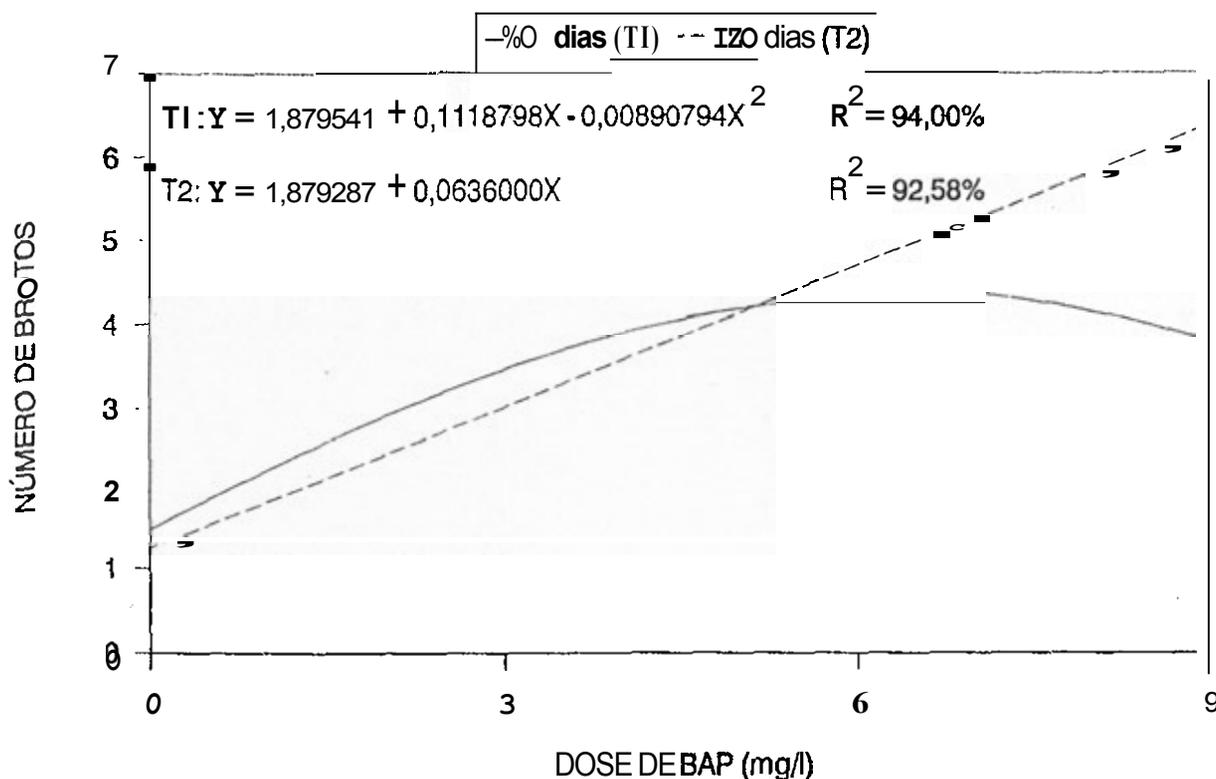


**FIGURA 1.** Efeito dos níveis de MS sobre o número total de brotos, em *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fazendo-se a contagem do número de brotos aos 90 dias, viu-se diferenças de produção de brotos de acordo com as diferentes concentrações de **BAP**.

Na Figura 2, derivando-se a equação polinomial, encontrou-se o ponto máximo de 6,29mg/l de **BAP** para uma produção de 4,29 brotos/explante com 90 dias, discordando dos dados obtidos por **BARROS & PASQUAL** (1989a) e concordando com os mesmos autores (1990) que afirmam que o número total de brotos aumenta

com o aumento de BAP dentro do intervalo estudado (0 a 6mg/l), ao trabalharem com *Coffea arabica*.

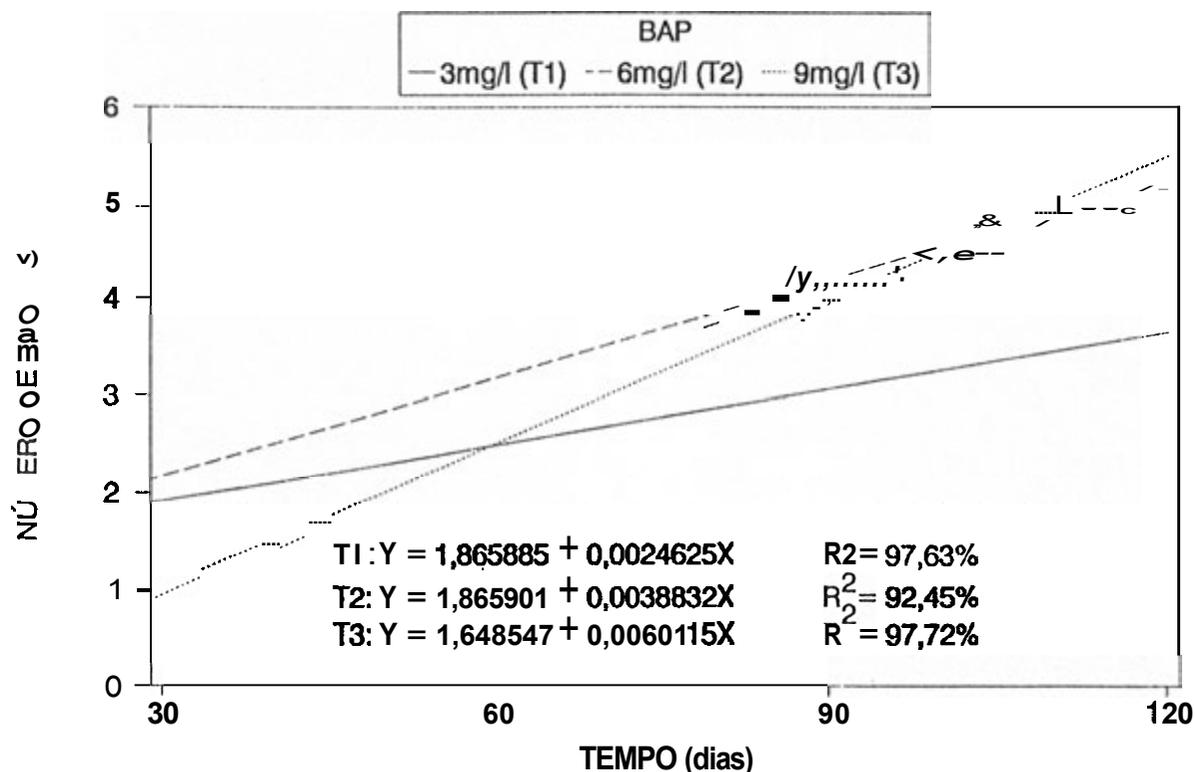


**FIGURA 2.** Efeito das doses de BAP dentro de 90 e 120 dias sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Na análise final, aos 120 dias após a inoculação, observa-se que a proliferação de brotos foi diretamente Proporcional aos níveis de BAP usados. Nestas bases, o nível de 9mg/l foi o que apresentou uma maior proliferação de brotos dentro do intervalo estudado, sendo que pelo uso da equação, afirma-se que, ao usar 9mg/l de BAP, obtém-se 6,62 novos brotos/explante após 120 dias da inoculação, de acordo com DUBLIN

(1991) quando relata um aumento na proliferação de brotos com o aumento de BAP no meio de cultura até a dose de 10mg/l.

Para o estudo dos diferentes períodos de avaliação dentro dos níveis de BAP (Figura 3), observou-se que na ausência total de BAP, o tempo não influenciou a proliferação de brotos, concordando com DUBLIN (1980b) e GUEVARA(1987b) os quais afirmam a necessidade de uma concentração mínima de citocinina para que haja o início da proliferação de brotos.



**FIGURA 3.** Efeito dos tempos de análise dentro dos diferentes níveis de BAP sobre o número total de brotos, em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Na presença de qualquer nível utilizado de BAP, quanto maior o tempo, maior será o número de brotos produzidos por explante. Pode-se afirmar que 120 dias foi o melhor tempo para a proliferação de brotos.

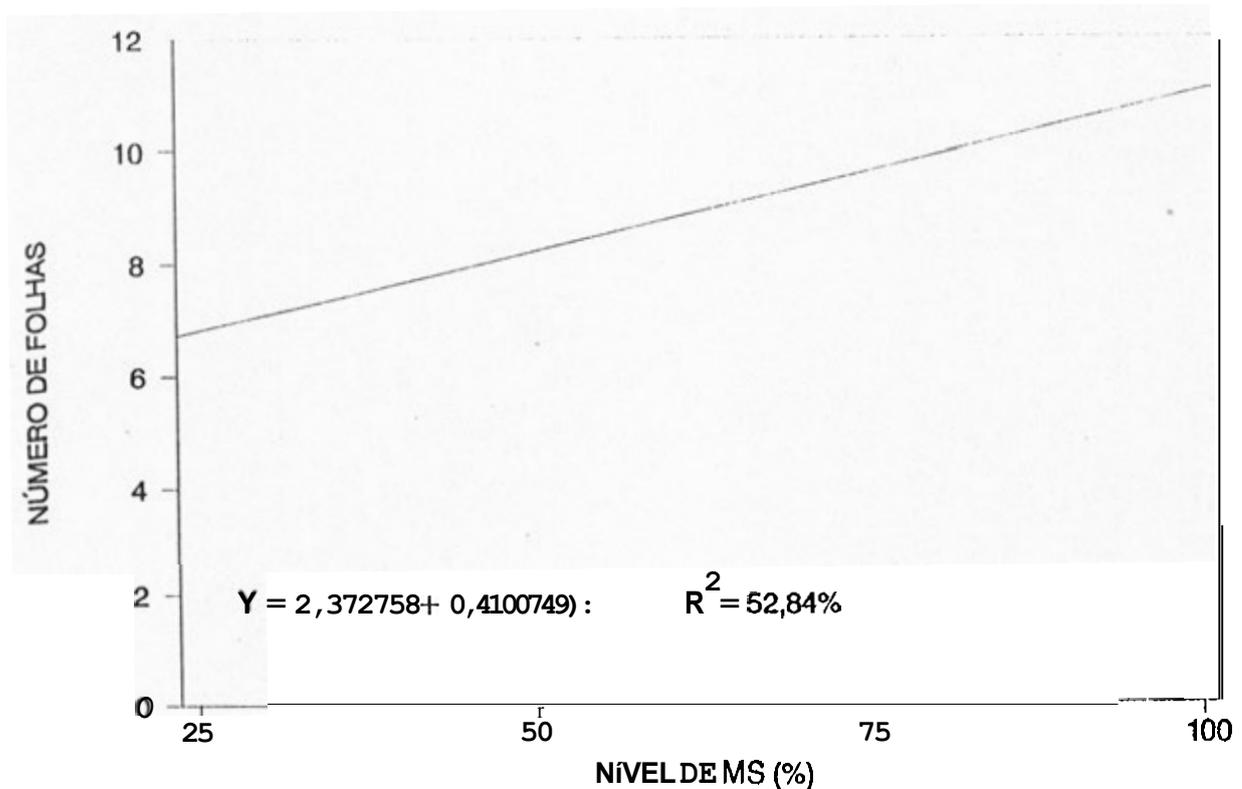
Para a variável número total de folhas, observa-se pelo Quadro 1 que a interação principal estudada "MS" x BAP não apresentou diferenças significativas para o nível de 5% de probabilidade, enquanto que para tempo, houve interação com o fator BAP.

Da mesma forma que para variável broto, o nível 0% de "MS" foi suprimido das análises.

Para os níveis de "MS" estudados, observa-se pela Figura 4, para se conseguir uma maior produção de folhas, o meio "MS" usado na totalidade de sua composição foi o que apresentou melhores resultados. Usando-se a equação, obteve-se 11,12 folhas por explante, enquanto que SONDAHL et alii (1984) usando "MS" a 25% num meio primário conseguiram um par de folhas por broto, em cafeeiro Catuaí, após 43 dias.

A correlação positiva indica que houve proporcionalidade entre os níveis de "MS" e a proliferação de folhas, isto é, à medida em que se aumenta a concentração dos Componentes do "MS" no meio, aumentou-se o número de folhas Produzidas.

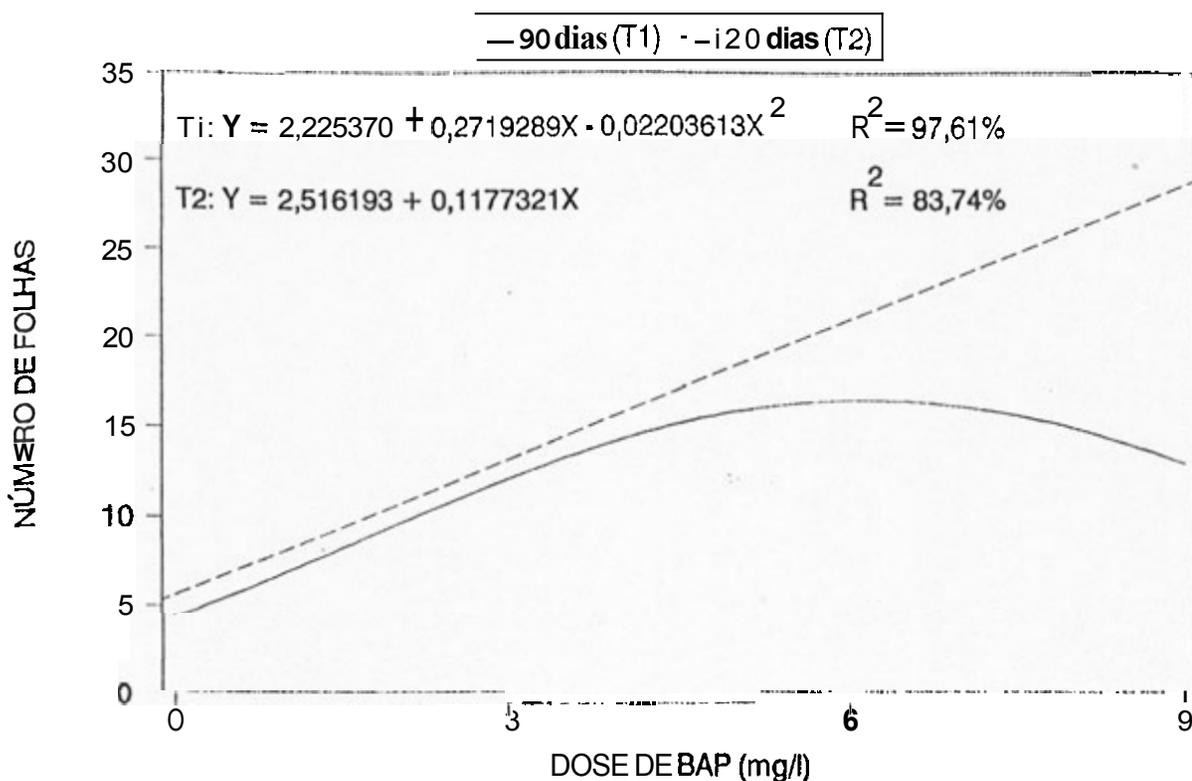
Como a interação BAP x tempo foi significativa, há a necessidade de desdobramento.



**FIGURA 4.** Efeito dos níveis de MS sobre o número total de folhas, em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Estudando-se BAP dentro de tempo, da mesma forma que para a variável broto, aos 30 e 60 dias após a inoculação, não se obteve diferenças significativas entre os níveis de BAP estudados, ou seja, o número total de folhas, até 60 dias da inoculação, não sofreu influência do uso de BAP em concentrações diversas, ou mesmo na sua ausência.

Aos 90 dias após a inoculação, a variável número total de folhas apresentou diferenças utilizando-se BAP em diversos níveis, obtendo-se 16,33 folhas/explante (ponto máximo de Produção) com 6,17mg/l de BAP (Figura 5).

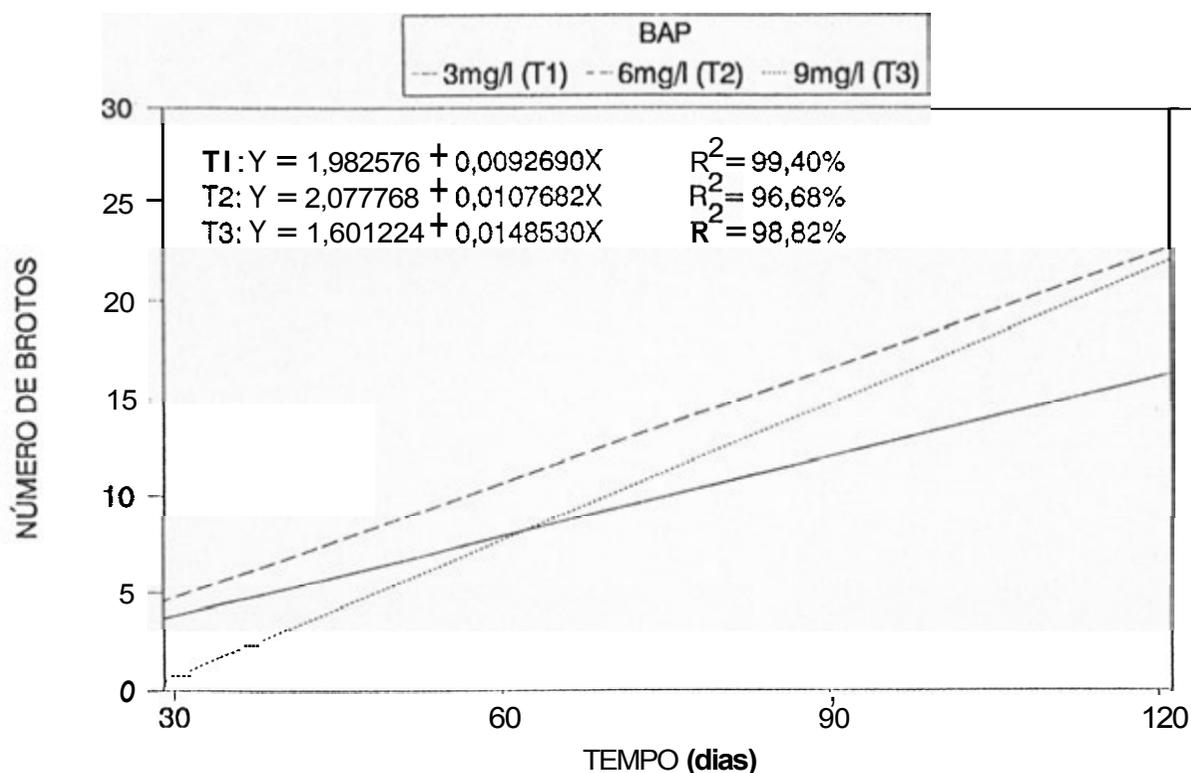


**FIGURA 5.** Efeito das doses de BAP dentro de 90 e 120 dias sobre o número total de folhas, em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Quando a avaliação foi realizada aos 120 dias após a inoculação, à medida em que se aumentou a concentração de BAP no meio, aumentou-se também a proliferação de folhas. Assim, no período de análise de 120 dias, pode-se afirmar que 9mg/l de BAP foi o nível onde ocorreu a maior produção de folhas/explante, provavelmente não em função do tamanho dos explantes, pois estes apresentavam-se pequenos e, sim do número total de brotos. No entanto, DUBLIN (1980b) afirma que o BAP usado na concentração de 1 a 10mg/l foi eficiente para a multiplicação de Arabusta.

Quando se fez o estudo do fator secundário tempo dentro

de BAP, observa-se que na presença de qualquer concentração de BAP houve um aumento no número de folhas em função do tempo, e que 120 dias foi o melhor tempo para se observar o número total de folhas produzidas (Figura 6). Na ausência de BAP, o tempo não influenciou o aumento do número de folhas.



**FIGURA 6.** Efeito dos tempos de análise dentro dos diferentes níveis de BAP sobre o número total de folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Observando-se o Quadro 2, pode-se afirmar que, no intervalo de 120 dias, os níveis de "MS" e BAP não foram expressivos o suficiente para produzir um número significativo de brotos com tamanho superior a 1cm, usando-se explantes contendo um par de gemas. Para esta variável, como os fatores não

apresentaram significância, o nível de 25% de "MS" e 0mg/l de BAP são os mais indicados e mais econômicos para a produção de brotos com mais de 1cm, confirmando dados obtidos por BARROS & PASQUAL (1990) que afirmam que o número de brotos com mais de 1cm diminui com o aumento da concentração de BAP, e discordando dos mesmos autores (1989a) que encontraram a concentração ótima de 0,5mg/l de BAP, para proliferação de brotos maior que 1,0cm.

QUADRO 2. Resumo da análise de variância sobre o número de brotos maior que 1cm, cor e peso seco em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		Número Brotos maior que 1cm	Cor	Peso da Matéria Seca
BAP	3	0,0117162	0,0496140	1,6946712*
MS	3	0,0363293	0,0830995	1,9446553*
BAP x MS	9	0,0253751	0,0897671	0,8012407
Erro (A)	48	0,0149920	0,0523561	0,5301374
C.V. (%)		10,43	13,93	22,49

A variável cor foi também analisada somente aos 120 dias, com um sistema de notas emitido por comparação entre os explantes. Da mesma forma que para brotos com mais de 1cm, não foram encontradas diferenças significativas nos fatores e nem na interação entre os mesmos. Pode-se, então, afirmar que os diferentes níveis de "MS" e BAP utilizados, no intervalo de 120 dias, não foram significativos para causar alterações na cor dos

brotos, diferente do que relatam ZOK & DUBLIN (1991), afirmando que em um meio pobre em nitrogênio e potássio, há um crescimento rápido das folhas de *Coffea arabica*, ocorrendo também uma descoloração das mesmas.

Como pode se observar no Quadro 2, os níveis de "MS" e BAP utilizados apresentaram diferenças expressivas sobre o peso da matéria seca, enquanto que a interação entre os fatores não foi significativa, mostrando assim a independência dos fatores, ou seja, os diferentes níveis de BAP não têm sua ação influenciada pelos diferentes níveis de "MS". O inverso também é verdadeiro.

No intervalo estudado (120 dias), a melhor concentração de BAP para peso da matéria seca foi de 9mg/l de BAP, coincidindo com a maior produção de peso seco dos explantes, provavelmente pelo maior número de brotos do explante sendo que quanto maior o número de brotos, tanto maior será o peso seco (Figura 7).

Na Figura 8, pela derivação da equação obteve-se o ponto máximo 0,71, ou seja 71% das quantidades de componentes do meio "MS" foi aquela que produziu a maior taxa de PS/explante (25,16mg/explante).

Dentro dos níveis de "MS" testados pode-se afirmar que 75% da concentração de "MS" foi o melhor nível para a produção de matéria seca dos explantes.

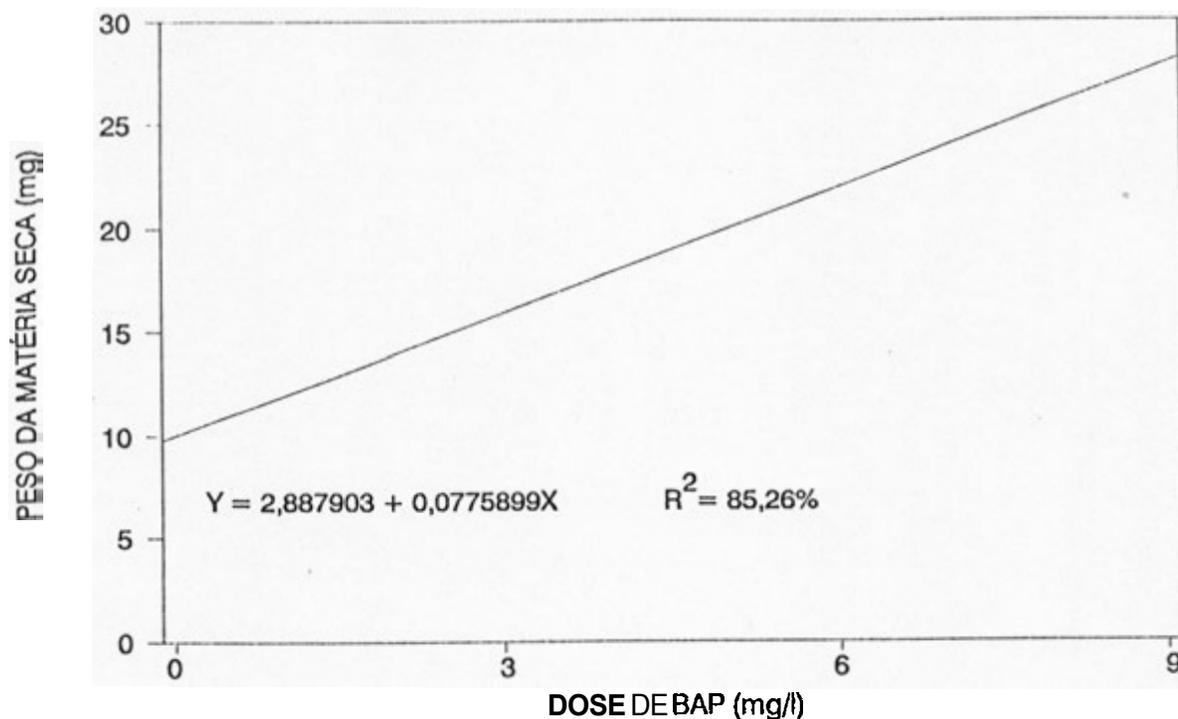


FIGURA 7. Efeito das doses de BAP sobre o peso da matéria seca em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

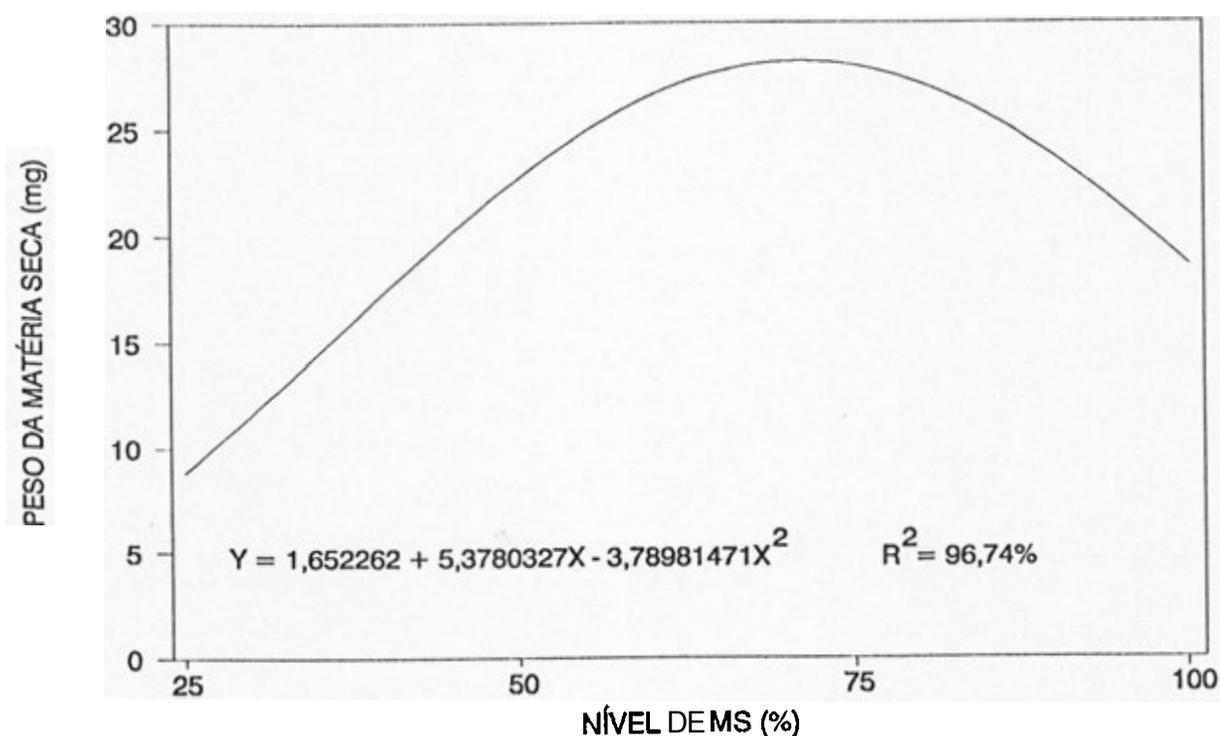


FIGURA a. Efeito dos níveis de MS sobre o peso da matéria seca em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

#### 4.2. Experimento 2: Número de Gemas X Níveis de BAP

De acordo com o Quadro 3, pode-se verificar que os fatores principais (BAP e gemas) são altamente significativos no estudo da variável número de brotos. Como o estudo foi realizado em parcela subdividida no tempo e a interação tripla foi significativa para o nível de probabilidade estudado, não se pode tirar conclusões dos fatores separadamente e sim fazer um estudo conjunto dos mesmos observando o seu comportamento e suas interações.

**QUADRO 3.** Resumo da análise de variância sobre número total de brotos e folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		Número Brotos	Número Folhas
Gemas	2	1,3811722**	8,4892417**
BAP	3	0,4878677**	2,6852538"
Gemas x BAP	6	0,2322640	1,4563610
Erro (A)	48	0,1094616	0,7626217
C.V. (%)		8,34	16,40
Tempo	3	0,6609169**	10,7057838**
Gemas x Tempo	6	0,0214584"	0,1030956
BAP x Tempo	9	0,1183727**	0,3130593**
Gemas x BAP x Tempo	18	0,0212844**	0,1195844**
Erro (B)	144	0,0086179	0,0541213
C.V. (%)		4,68	8,74

Estudando-se o número de gemas dentro de BAP e tempo, verifica-se que, na ausência da citocinina BAP, o número de gemas não influenciou o número total de brotos em nenhum dos períodos analisados, ou seja, quando o meio de cultura não foi suplementado com BAP, o número de gemas do explante não alterou o número de brotos produzidos, independente do tempo decorrido para o crescimento dos mesmos.

Quando se usou o BAP na concentração de 3mg/l, da mesma forma que na ausência do regulador de crescimento, o número de gemas não influenciou a produção total de brotos em qualquer dos períodos de análise, coincidindo com KRİKORIAN et alii (1987) os quais afirmam que um meio mínimo, sem a adição de reguladores de crescimento, raramente serve de veículo para suportar um crescimento de tecidos normais. Pode-se afirmar que o número de brotos produzidos não foi alterado pelo tamanho do explante, independente do tempo decorrido para o crescimento dos mesmos. Ao utilizar 6mg/l de BAP no meio, durante a fase de crescimento até 90 dias após a inoculação, o número de gemas não influenciou a produção total de brotos. Na análise final aos 120 dias, observou-se que o número de brotos foi alterado pelo número de gemas presentes no explante.

Observa-se que ao se usar 6mg/l de BAP, aos 120 dias após a inoculação, um explante contendo 4,9 gemas produziu 8,74 brotos, discordando com DUBLIN (1991) o qual afirma que para a micropropagação há a necessidade do explante ter um par de gemas com folhas reduzidas à metade (Figura 9).

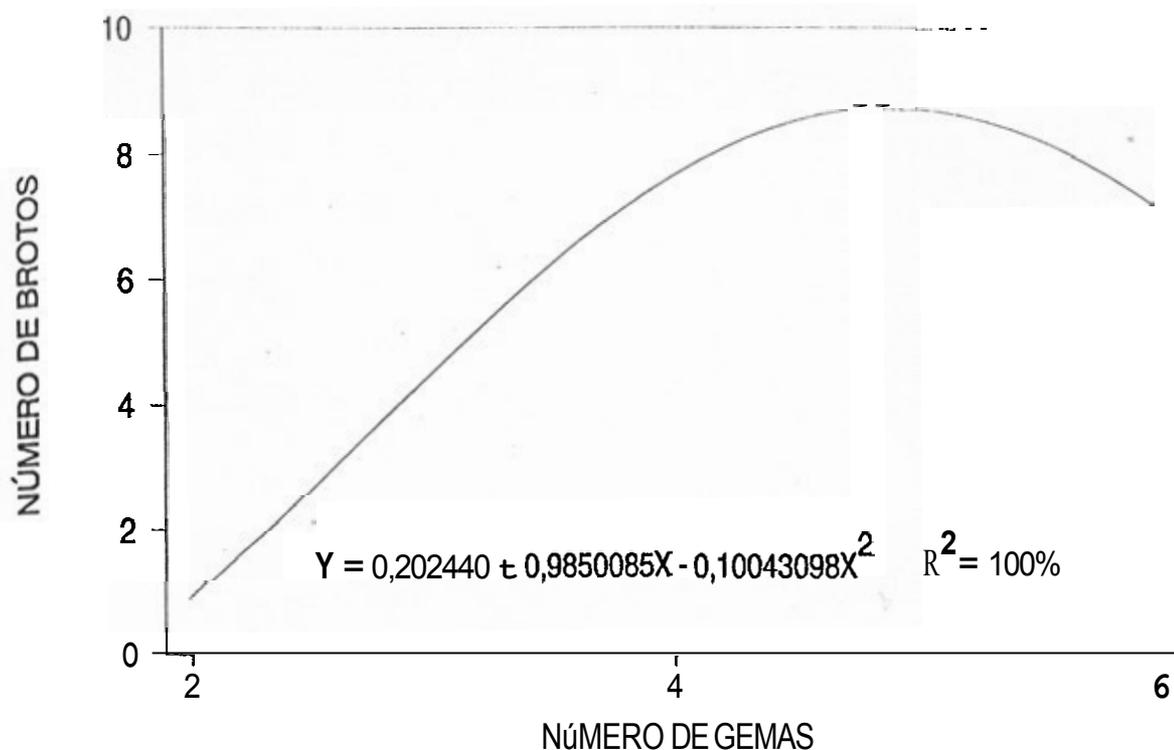


FIGURA 9. Efeito do número de gemas dentro de 6mg/l de BAP e 120 dias de análise sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Com o uso de 9mg/l de BAP no meio de cultura, o número de gemas no explante não interferiu na produção total de brotos. Pode-se afirmar que, em qualquer época de análise, o número de gemas do explante não influenciou o número de brotos produzidos quando a concentração de BAP foi de 9mg/l, concordando com CUSTER (1980) que obteve seu melhor resultado com 7 semanas e 10mg/l de BAP.

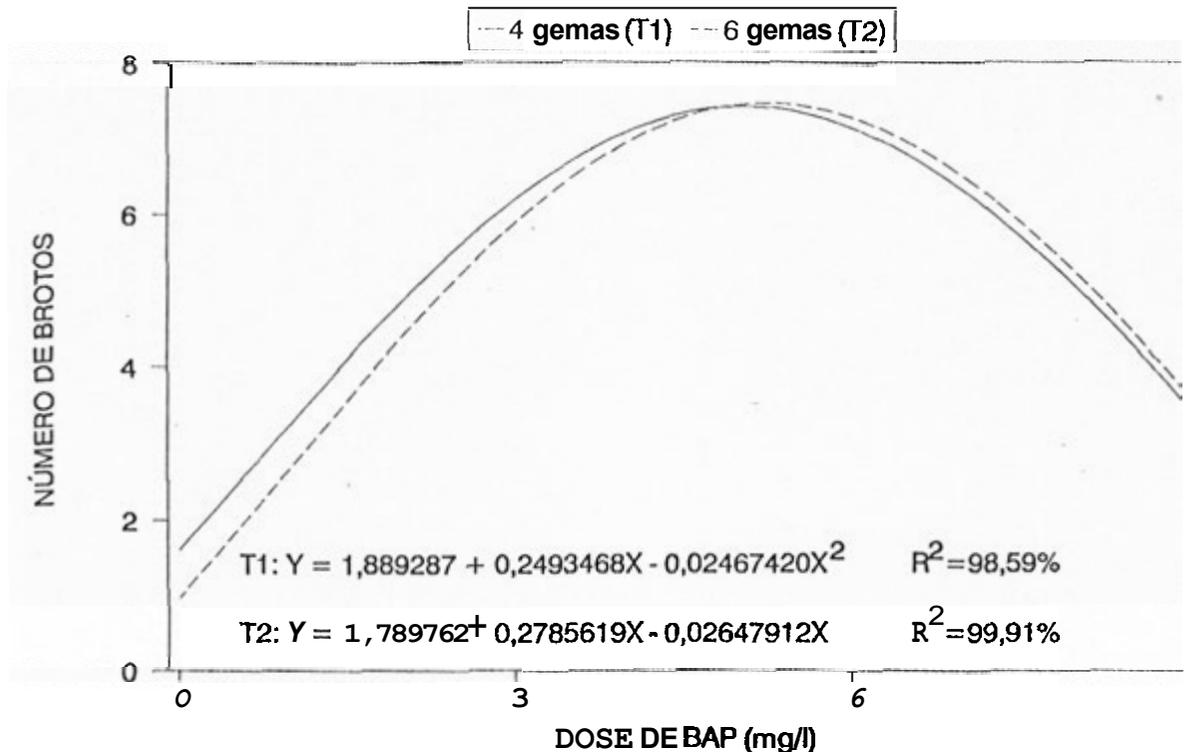
Comparando-se os resultados quando se usou 6 e 9mg/l de BAP, pode-se supor que a equação quadrática significativa no uso de 6mg/l, após 90 dias de inoculação, indica que explantes com

tamanhos superiores a 4,9 gemas necessitam de uma suplementação de **BAP** superior a 6mg/l, o que foi comprovado pelo nível de 9mg/l que supre as necessidades dos explantes de todos **os** tamanhos.

Estudando-se **os** níveis de **BAP** dentro de gemas e tempo, pode-se afirmar que quando se usa explantes contendo um par de gemas., não importa o nível de **BAP** usado pois este não vai influenciar a produção de brotos no intervalo de tempo analisado. **As** diferentes concentrações de **BAP** utilizadas não produziram efeitos no aumento do número de brotos quando o explante possui apenas um par de gemas, ao contrário do que afirma **DUBLIN** (1991) quando indica, como ideais para a micropropagação, explantes com um par de gemas, provavelmente em função do explante de café ser muito sensível nas subculturas, de acordo com **SONDAHL & SHARP** (1977).

**Ao** se usar explantes contendo dois pares, ou seja, quatro gemas, do período inicial até **os** 90 dias de inoculação, **os** diferentes níveis de **BAP** não influenciaram a produção total de brotos, contudo, aos **120** dias, observou-se um comportamento diferenciado da produção de brotos em função das diferentes concentrações de **BAP** utilizadas (Figura 10).

Utilizando-se explantes com dois pares de gemas, 5,05mg/l foi o nível que exibiu maior efeito sobre a produção de brotos (7,43 brotos/explante), confirmando dados de **ZOK & DUBLIN** (1991) os quais afirmam que as concentrações de **BAP** mais eficientes estão ao redor de 5mg/l.



**FIGURA 10.** Efeito dos níveis de BAP dentro de 4 e 6 gemas e 120 dias de análise sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

No uso de explantes com três pares de gemas, desde a inoculação até 90 dias após a mesma, as diferentes concentrações de BAP usadas não interferiram na produção total de brotos. Da mesma forma que quando se usou explantes contendo 2 pares de gemas, a análise de regressão aos 120 dias apresentou diferenças significativas, mostrando uma produção de brotos diferenciada pelos níveis de BAP utilizados.

Observa-se que, ao usar explantes contendo três pares de gemas, o nível de BAP de 5,26mg/l foi o que produz o maior número de brotos (7,43 brotos/explante).

Comparando-se os resultados dos explantes com dois e três pares de gemas, aos 120 dias (Figura 10), pode-se afirmar que explantes contendo dois pares de gemas e um nível de 5,05mg/l foi o par ideal para a produção de brotos obtidos em 120 dias após a inoculação, confirmando DUBLIN (1984), quando indica níveis ideais de 5,0mg/l de BAP.

Para o tempo, fator secundário, independentemente do número de gemas do explante, quando não se usou BAP, o tempo não influenciou a proliferação de brotos, ou seja, na ausência de BAP, com qualquer número de gemas contidas no explante, com o passar do tempo não houve uma maior produção de brotos.

Já na presença de qualquer nível de BAP estudado, para qualquer número de gemas, o tempo agiu numa de forma diretamente proporcional na produção de brotos. Sendo assim, pode-se afirmar que na presença de BAP, conforme relata GUEVARA (1987b), que o BAP, é a citocinina que melhor estimula a proliferação de gemas axilares e brotos. Independente do número de gemas do explante, têm-se um maior número de brotos por explante com o transcorrer do tempo. Dentro do intervalo estudado, pode-se afirmar que 120 dias foi o melhor tempo para a produção de brotos (Figuras 11, 12 e 13).

Para a variável folha, observou-se que a significância da interação principal (Gemas e BAP) não foi relevante para o nível de probabilidade estudado, sendo que o efeito dos fatores, isoladamente foi significativo. Como a interação tripla, que inclui o tempo na subparcela do experimento, foi significativa, não se pode tirar conclusões particularizadas dos fatores e

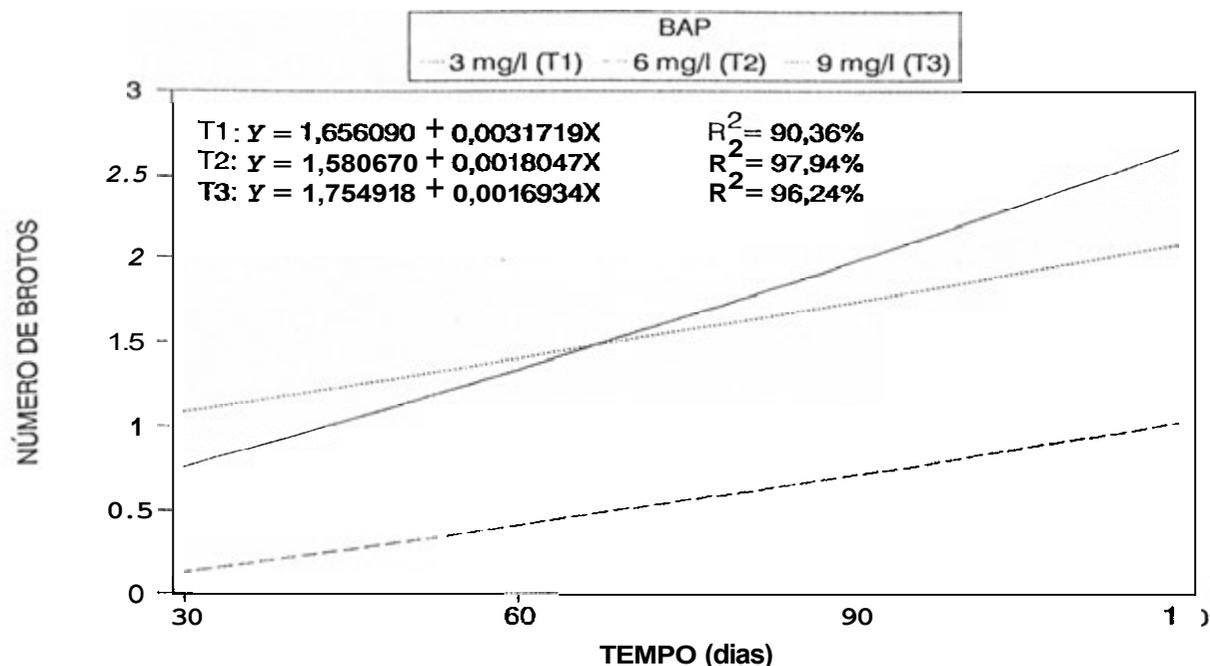


FIGURA 11. Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP e explantes com 2 gemas sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

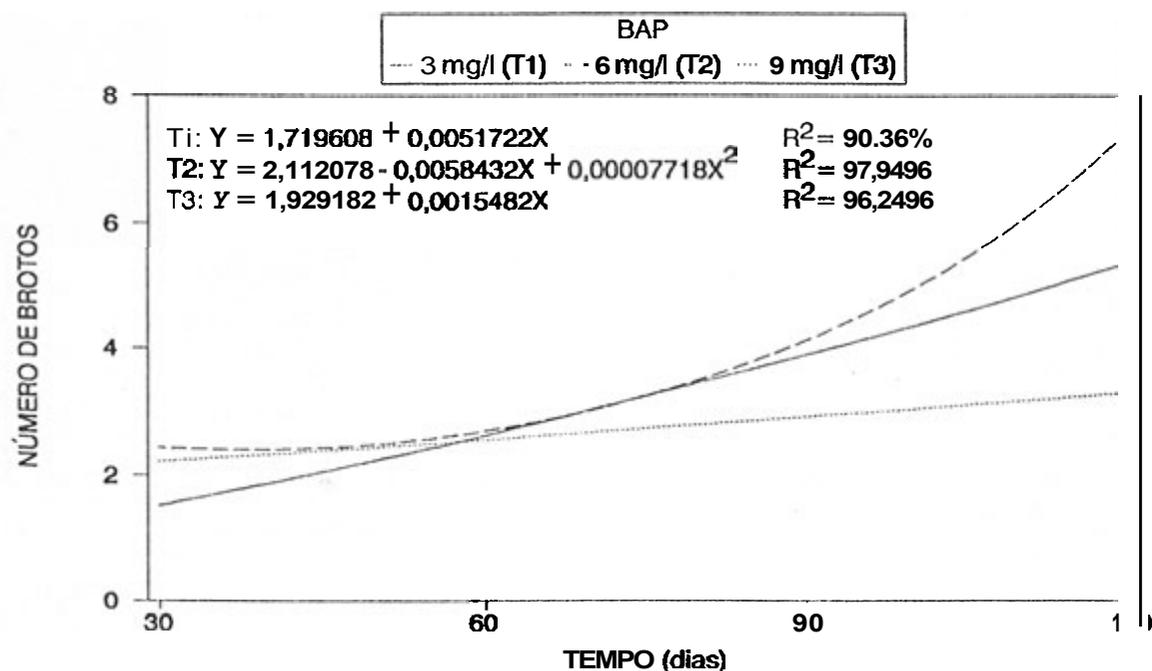
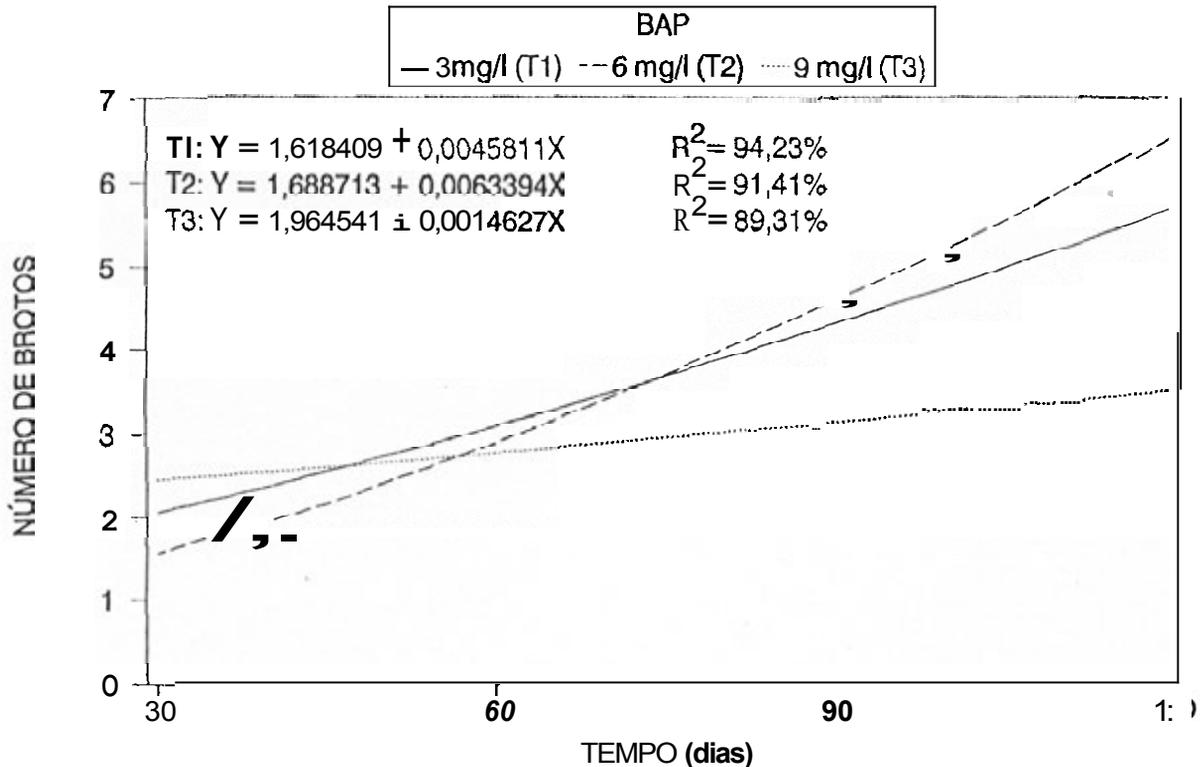


FIGURA 12. Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP e explantes com 4 gemas sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.



**FIGURA 13.** Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP e explantes com 6 gemas sobre o número total de brotos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

assim, tem-se que fazer os desdobramentos necessários para o estudo dos resultados.

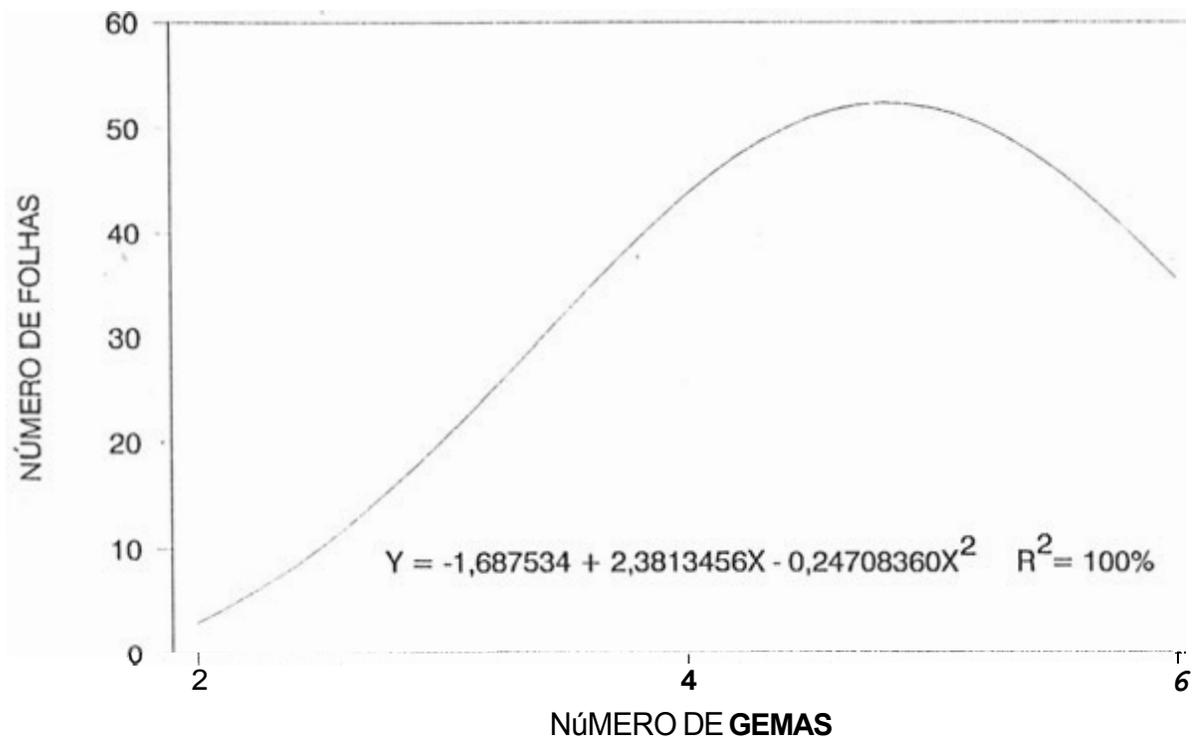
Estudando-se gemas dentro de BAP e tempo, observou-se que, na ausência do BAP, o número de gemas do explante não interferiu no número total de folhas produzidas. Pode-se afirmar que, quando o meio não apresentou, na sua constituição, nenhum tipo de regulador de crescimento, o número de gemas do explante não influenciou a produção de folhas, nos 120 dias analisados.

Da mesma forma que na ausência de BAP, quando se usou 3mg/l acrescidos ao meio de cultura, o número de gemas do

explante não produziu efeito significativo no aumento do número de folhas, até **os** 120 dias após a inoculação.

Para **o** nível de 6mg/l de BAP, pode-se afirmar que **o** número de gemas não influenciou a produção de folhas desde a inoculação até **90** dias após a mesma.

Aos **120** dias após a inoculação, viu-se claramente **o** efeito no número de gemas sobre a produção de folhas quando **o** BAP está presente a um nível de 6mg/l (Figura 14).



**FIGURA 14.** Efeito do número de gemas dentro de 6mg/l de BAP e 120 dias de análise sobre **o** número total de folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Com **os** dados obtidos pela derivação, pode-se afirmar que **4,90** foi **o** número ideal de gemas para a produção máxima de

folhas (52,32 folhas/explante), usando-se 6mg/l de BAP, aos 120 dias após inoculação, resultados semelhantes aos de DUBLIN (1984) quando utilizou explantes com dois nós para a micropropagação, só que inoculados horizontalmente.

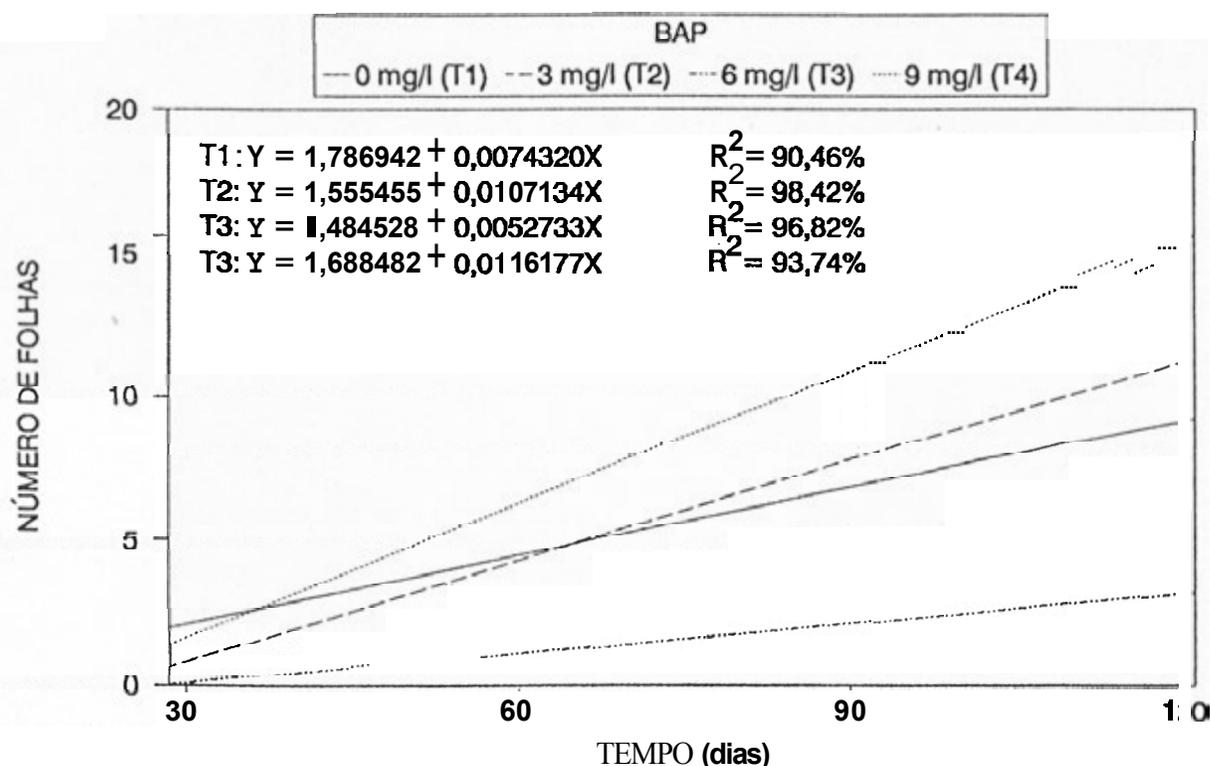
Usando-se 9mg/l de BAP, o quadro reverteu-se e obteve-se a mesma situação que para os níveis de 0 e 3mg/l de BAP. Pode-se afirmar que no uso de 9mg/l, o número de gemas do explante não interferiu na produção de folhas, no intervalo de 120 dias estudados, talvez porque explantes contendo um número maior de gemas necessite de um maior suprimento exógeno para a proliferação de folhas.

Estudando-se BAP dentro de gemas e tempo, para a produção de folhas, independente do número de gemas contido no explante, dentro do intervalo analisado de 120 dias, os diferentes níveis de BAP, ou mesmo a ausência da citocinina não influenciaram a produção total de folhas. Isto evidencia a ação do BAP sobre a multiplicação do material vegetal, ou seja, proliferação de brotos, não possuindo efeito significativo sobre o crescimento dos mesmos. Estes resultados confirmam relatos de SACHS & THIMANN (1967) que evidenciam a ação das citocininas para causar o início da brotação, e, segundo GUEVARA (1987b) são as auxinas que estimulam o crescimento de brotos e folhas em diferentes concentrações, sempre mais altas para o crescimento dos brotos.

Para o fator tempo, na produção de folhas, independentemente do número de gemas contido no explante e também dos níveis de BAP usados, observou-se que em todas as combinações

de BAP e gemas, houve um efeito significativo da regressão linear, mostrando que o tempo age diretamente sobre o número total de folhas (Figuras 15, 16 e 17).

Com o passar do tempo observou-se um aumento no número total de folhas. Então pode-se afirmar, dentro do intervalo estudado, que 120 dias foi o melhor tempo para a proliferação de folhas.



**FIGURA 15.** Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP em explantes com 2 gemas sobre o número total de folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

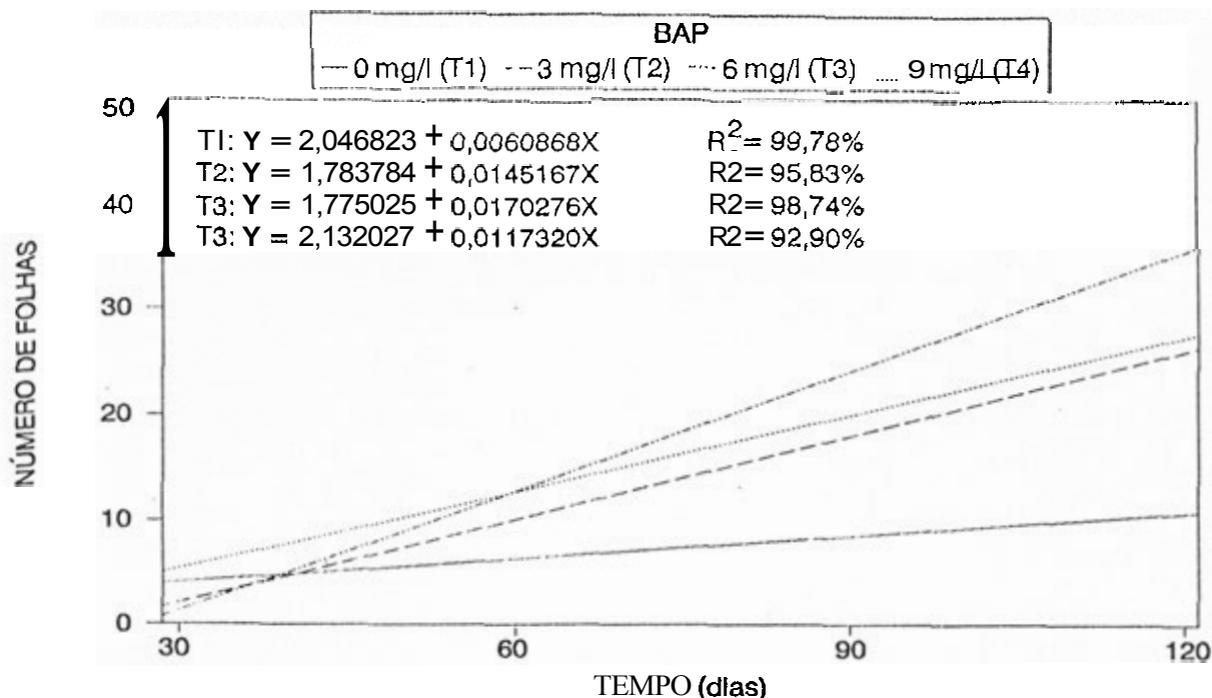


FIGURA 16. Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP em explantes com 4 gemas sobre o número total de folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

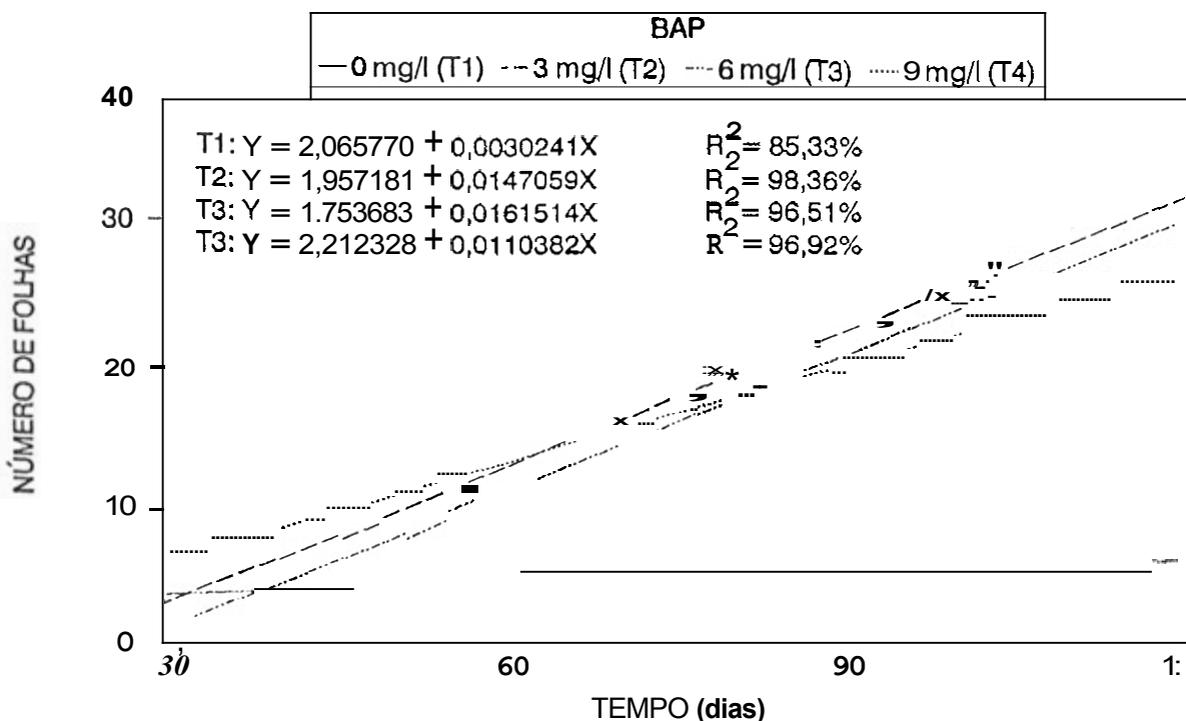


FIGURA 17. Efeito do tempo dentro dos diferentes níveis de BAP em explantes com 6 gemas sobre o número total de folhas em *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Analisando-se a variável broto maior que 1cm, pelo quadro 4 verificou-se que gemas e BAP produziram variações significativas na produção de brotos maiores de 1cm, embora a interação entre os fatores não tenha sido significativa. BAP e gemas interferiram na produção de brotos com mais de 1cm, independentemente um do outro.

QUADRO 4. Resumo da análise de variância sobre o número de brotos maior que 1cm, cor e peso da matéria seca em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Medios		
		Número Brotos maior que 1cm	Cor	Peso da Matéria Seca
Gemas	2	0,1174205*	0,7356748**	2,6883697**
BAP	3	0,3161094**	0,1692737*	1,0065442"
Gemas x BAP	6	0,0416339	0,0527057	0,7038281
Erro (A)	48	0,0363077	0,0597793	0,3402667
C.V. (%)		20,68	14,08	15,25

Pelo estudo de regressão para os diferentes níveis de gemas, observou-se que apenas a regressão linear foi capaz de representar bem as variações ocasionadas na produção de brotos com mais de 1cm, decorrentes dos diferentes número de gemas do explante (Figura 18).

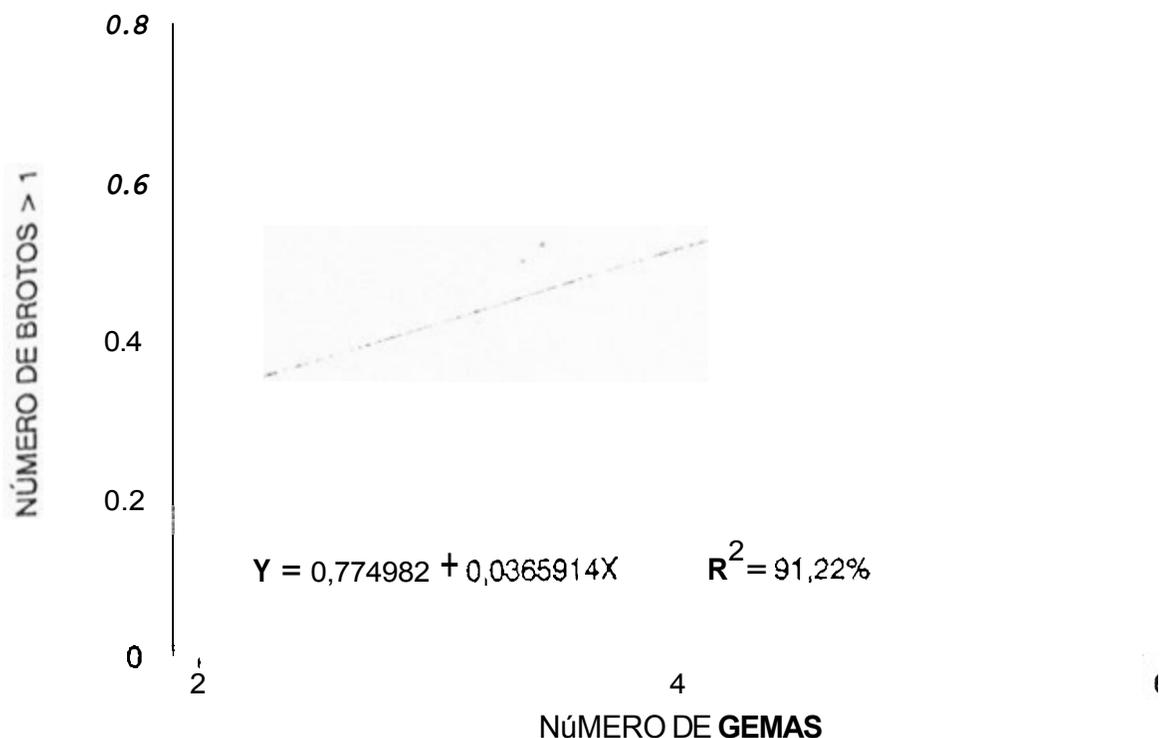


FIGURA 18. Efeito do número de gemas do explante sobre o número total de brotos maior que 1cm em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44.. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Nota-se que à medida em que se aumentou o número de gemas no explante, aumentou-se proporcionalmente as chances de se obter brotos com tamanho superior a 1cm. DUBLIN (1984) afirma que para se obter rapidamente brotos vigorosos, deve-se usar explantes com dois nós, ou seja, 2 pares de gemas.

Já no estudo de regressão para os níveis de BAP, verifica-se que a regressão quadrática foi a que melhor representou as diferenças significativas na produção de brotos com mais de 1cm por efeito dos diferentes níveis de BAP, discordando dos estudos com *Coffea arabica* de BARROS & PASQUAL

(1990) que afirmam que o decréscimo do número de brotos maior que 1cm é proporcional ao aumento da concentração de BAP (Figura 19).

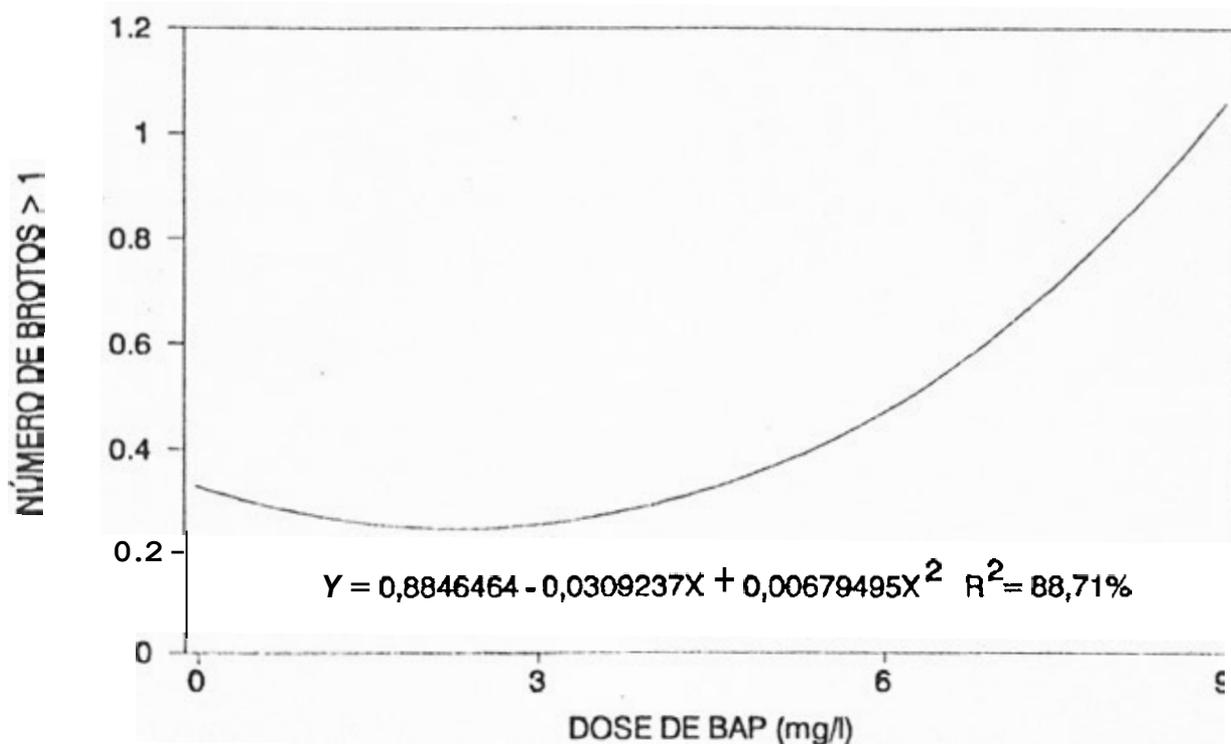


FIGURA 19. Efeito das doses de BAP sobre o número total de brotos maiores que 1cm em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Pela derivação da equação obteve-se o ponto mínimo, ou seja, 2,28mg/l de BAP foi o nível que produziu o menor número de brotos maiores de 1cm (0,20 brotos com mais de 1cm/explante), e o nível de 9mg/l foi o que produziu um maior número de brotos com mais de 1cm.

Para a variável cor, da mesma forma que na variável anterior, os fatores interferiram significativamente nos resultados independentemente um do outro, sendo que a interação entre os dois não se mostrou significativa para o nível de

probabilidade avaliado. BAP e gemas produziram variações significativas na cor, mas agiram sem que houvesse interferência na ação entre os mesmos.

Para o número de gemas usadas, verifica-se que à medida que se aumentou o número de gemas por explante, os brotos apresentaram coloração verde mais intensa, sendo considerados, pela análise visual, mais vigorosos (Figura 20).

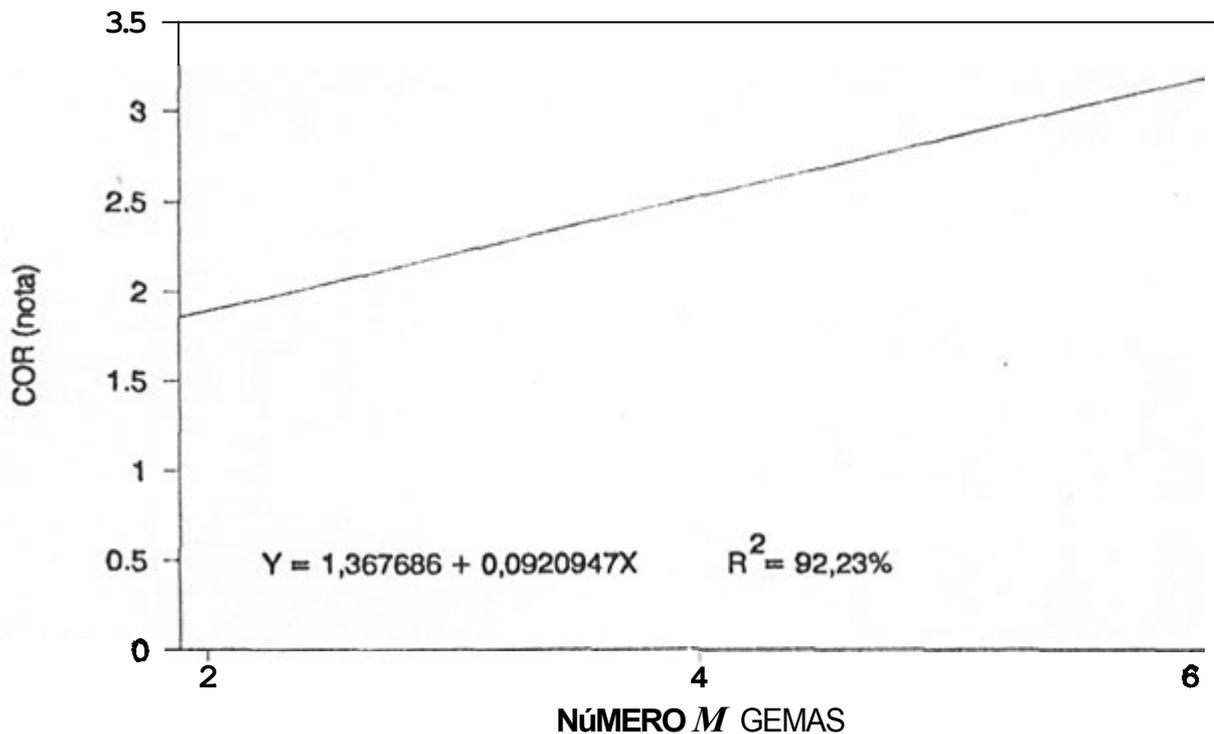


FIGURA 20. Efeito do número de gemas do explante sobre a cor em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Dentro do intervalo estudado, pode-se afirmar que os brotos que possuem verde mais intenso são aqueles derivados de explantes contendo três pares de gemas.

Para os níveis de BAP influenciando as diferenças na cor dos brotos, nota-se, que à medida que se aumentou a concentração de BAP no meio de cultura, houve um acréscimo na intensidade da pigmentação dos explantes. Os brotos que apresentaram coloração verde mais intensa, dentro do intervalo estudado, foram os colocados em meio contendo 9mg/l de BAP (Figura 21).

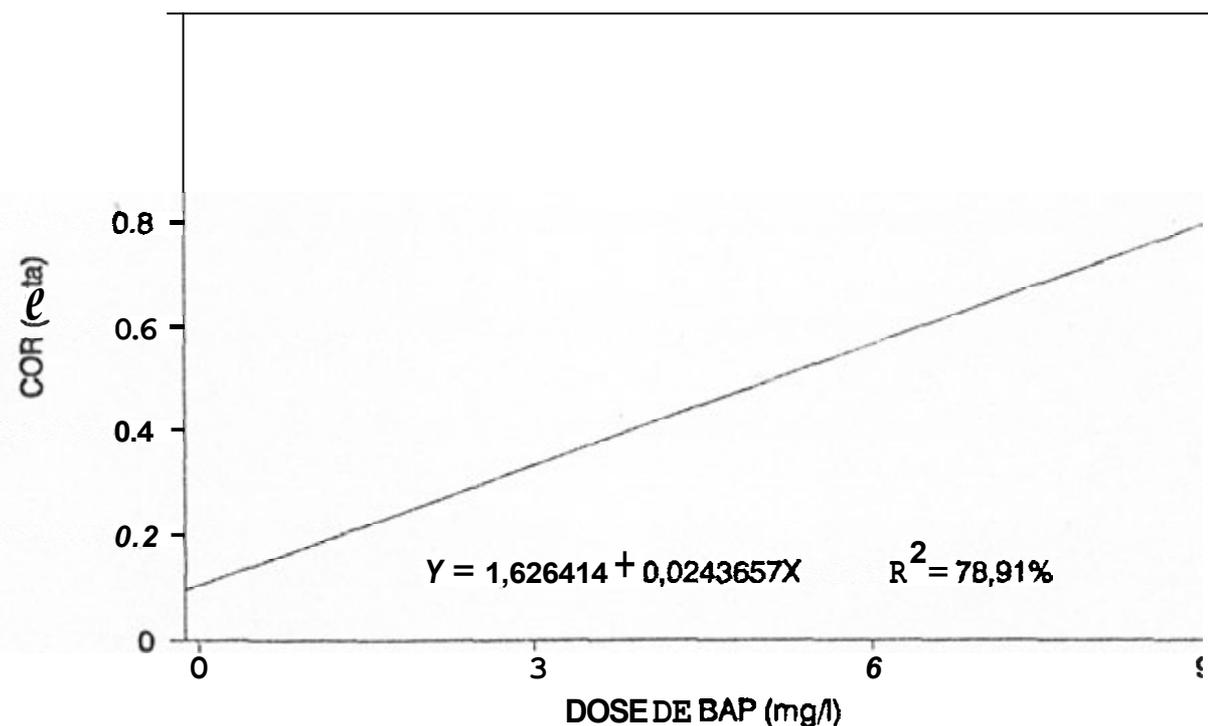


FIGURA 21. Efeito das doses de BAP sobre a cor em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Conforme mostra o Quadro 4, gemas e BAP influenciaram significativamente a produção de matéria seca dos brotos. A interação dos dois fatores não apresentou variações relevantes

para o nível de probabilidade estudado, sugerindo assim, a independência de ação dos mesmos.

Os brotos que apresentaram maior peso da matéria seca, dentro do intervalo estudado, são os brotos oriundos de explantes contendo três pares de gemas (Figura 22).

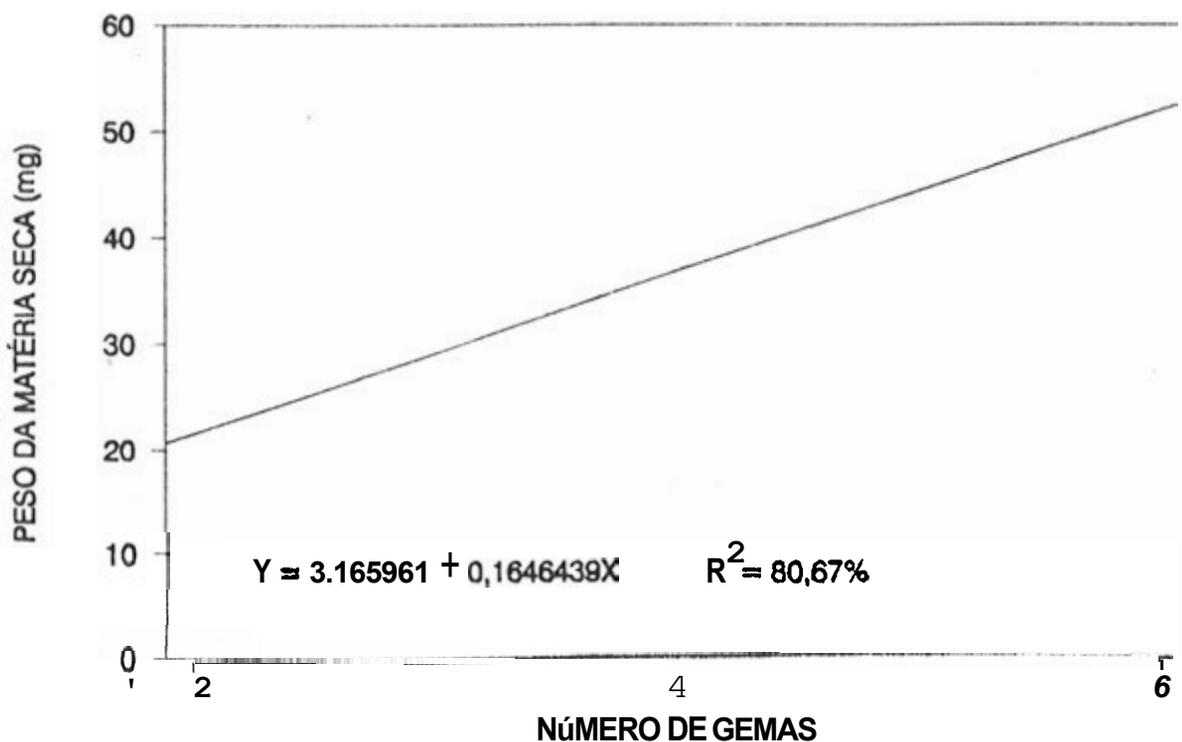


FIGURA 22. Efeito do número de gemas do explante sobre o peso da matéria seca em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Então, assim, quando se aumentou o tamanho do explante, há também um aumento de matéria seca produzida, talvez por explantes maiores serem mais resistentes e possuírem uma capacidade de produção de brotos maior, em função de

apresentarem-se com um maior número de gemas. SONDAHL & SHARP (1977) observaram a fragilidade dos explantes de café, provavelmente por serem excisados muito pequenos.

Para os diferentes níveis de BAP, à medida em que se aumenta a concentração de BAP no meio, houve um aumento de peso seco dos explantes. Para explantes cultivados em meio contendo 9mg/l de BAP, o peso seco é de 46,99mg/explante (Figura 23).

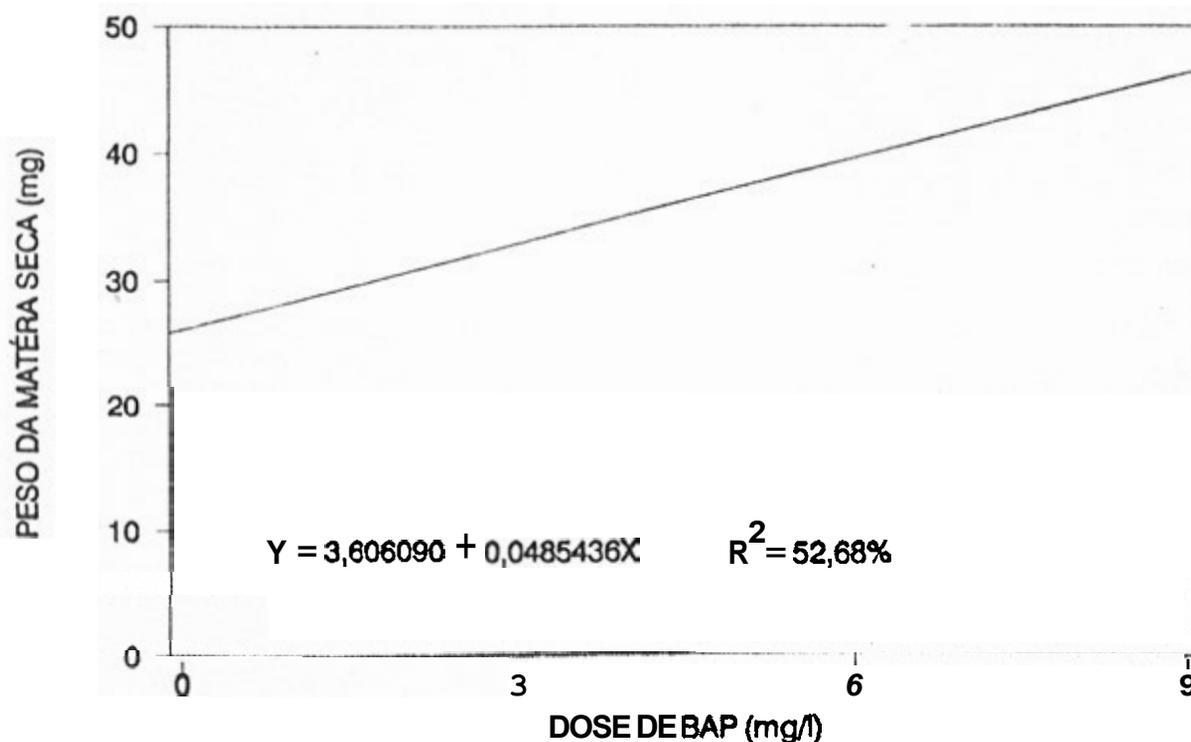


FIGURA 23. Efeito das doses de BAP sobre o peso da matéria seca em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Então, dentro do intervalo estudado pode-se afirmar que 9mg/l foi o melhor nível de BAP para a produção de peso da matéria seca.

#### 4.3. Experimento 3 Níveis de cinetina X Níveis de 2,4-D

Pelo Quadro 5, observou-se que apenas os diferentes níveis de 2,4-D foram significativos na alteração do crescimento de calos enquanto a interação com o fator secundário, tempo, apresentou significância para o nível de probabilidade estudado.

QUADRO 5. Resumo da análise de variância para tamanho e fenótipo dos calos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		Tamanho (nota 1-6)	Fenótipo (nota 1-6)
cinetina	4	0,3219705	0,1982750
2,4-D	2	2,0500741**	2,5750695**
Cinetina x 2,4-D	8	0,2150836	0,1449376
Erro (A)	60	0,1528897	0,1449251
C.V. (%)		9,62	10,46
Tempo	3	1,4228026**	5,9644270**
Cinetina x Tempo	12	0,0603191	0,0394209
2,4-D x Tempo	6	0,1642827**	0,0502061
Cinetina x 2,4-D x Tempo	24	0,0321075	0,0292224
Erro (B)	180	0,0438264	0,0265092
C.V. (%)		10,30	8,95

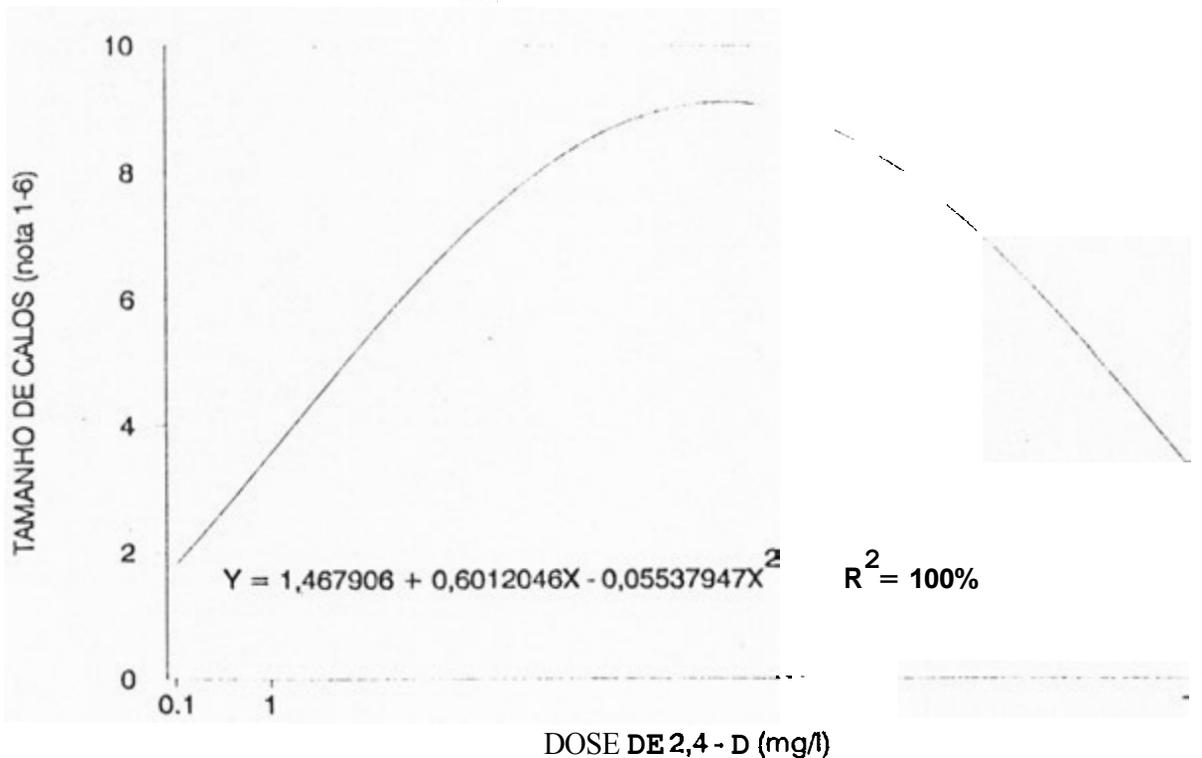
Os níveis de 0,0 e 0,01mg/l de 2,4-D foram retirados das análises por não terem apresentado nenhum tipo de calo, durante todo o período analisado (4 meses).

A cinetina, em todos **os** períodos avaliados, não apresentou significância para **o** crescimento dos calos. Pode-se afirmar que **os** diferentes níveis de cinetina não influenciaram a proliferação de calos de café, concordando com DUBLIN (1981) que produziu calos na ausência de cinetina com concentrações de 2,4-D entre 0,01 a 1,0mg/l e LONDOÑO et alii (1981) que obtiveram crescimento ótimo de calos, usando diferentes concentrações de 2,4-D, sem adição de nenhum tipo de citocinina.

Assim, observa-se que **o** processo de início e proliferação de calos em função de seu crescimento **não** teve a necessidade (exógena) da cinetina. **Os** dados discordam de SONDAHL & SHARP (1977a) que relatam a necessidade de um mínimo de cinetina essencial para iniciar **o** proceso. CROCOMO et alii (1975) trabalhando na obtenção de calos com 0,05mg/l de cinetina, obtiveram brotos em alguns explantes subcultivados, evidenciando assim **o** efeito da citocinina no estímulo à brotação, e YASUDA et alii (1985) ao afirmarem a necessidade de auxinas para **o** início e crescimento dos calos.

Como **há** interação entre **os** fatores 2,4-D e tempo, **há** a necessidade de se fazer **os** desdobramentos.

Estudando-se 2,4-D dentro dos diferentes níveis de tempo, para **o** primeiro período estudado (25 dias) nota-se que para a obtenção de calos de tamanho grande, em café, após três semanas da inoculação, deve-se usar 5.43mg/l de 2,4-D, de acordo também com SHARP et alii (1973) e LONDOÑO (1981) que tiveram ótimo crescimento de calos com altos níveis de auxinas (Figura 24).

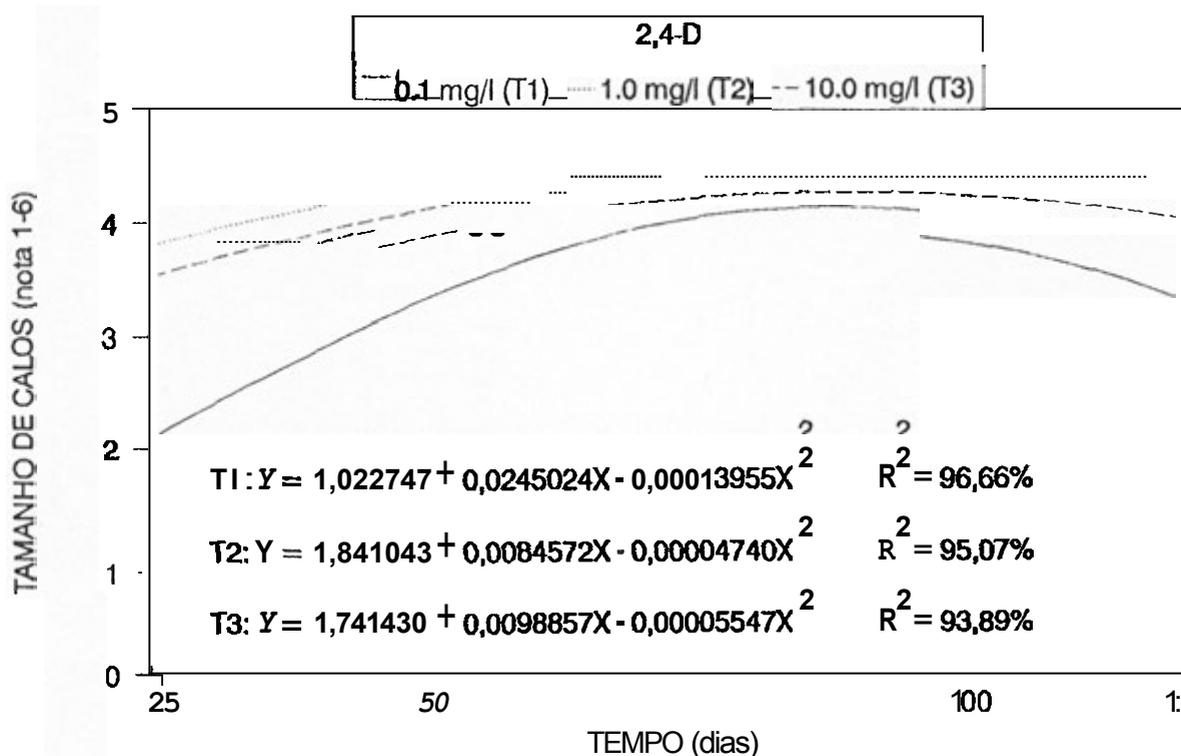


**FIGURA 24.** Efeito dos níveis de 2,4-D dentro de 25 dias sobre o tamanho dos calos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Para os outros períodos (50, 100 e 120 dias) os diferentes níveis de 2,4-D não provocaram diferenças significativas na proliferação de calos. Com isso, pode-se afirmar que após 50 dias da inoculação, as diferentes concentrações de 2,4-D não provocam alteração no tamanho dos calos.

Verifica-se que após o período inicial de indução e crescimento, os diferentes níveis de 2,4-D utilizados não modificaram o processo, provavelmente pelo tempo de ação do regulador de crescimento ser limitado, sendo que após 50 dias há a necessidade de transferências para um novo meio, se a intenção é de multiplicação rápida dos calos.

Para o nível de 0,1mg/l da auxina, derivando-se a equação, obteve-se o ponto de 87,82 dias para o maior crescimento de calos, no uso de 0.1mg/l de 2,4-D. Os calos obtidos possuíram o tamanho pequeno a médio, de acordo com HERMAN & HASS (1975), que obtiveram baixo crescimento de calos usando o mesmo nível da auxina, acrescentando 0.1mg/l de cinetina (Figura 25).



**FIGURA 25.** Efeito dos tempos de análise dentro de níveis de 2,4-D sobre o tamanho dos calos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Quando se usou 1,0mg/l de 2,4-D, o ponto máximo de 89,21 dias foi o período de maior crescimento dos calos de tamanho grande, semelhantes aos resultados de DUBLIN (1981), que

obteve calos com concentrações de 0,01 a 1,0mg/l com o início de crescimento em 6 semanas.

Para 10,0mg/l de 2,4-D, o ponto máximo de 89,06 dias obtido pela derivação mostra o período em que se obteve o maior crescimento dos calos para a concentração em estudo que produziu calos de tamanho médio.

Por estes dados, observou-se que a 'concentração de 10mg/l não influenciou positivamente o crescimento dos calos, produzindo calos' com tamanho inferior aos obtidos com o uso de 1mg/l da auxina. Afirma-se também que 12 semanas foi o tempo ideal para o maior crescimento de calos, independentemente da concentração de 2,4-D, diferindo das observações de LONDOÑO et alii (1981) quanto ao tempo de crescimento ótimo que foi, por ela obtido, em 7 semanas com altas concentrações de 2,4-D.

Para a variável fenótipo, observou-se que dos fatores principais, apenas o 2,4-D atuou sobre os fenótipos dos calos, sendo que os diferentes 'níveis de cinetina não produziram diferenças significativas. O tempo, fator secundário, apenas isoladamente apresentou diferenças significativas para o nível de probabilidade estudado. A cinetina, dentro do nível estudado, não apresentou mudanças significativas no fenótipo (Figura 26).

Assim, pode-se que notar que a exclusão da cinetina 'do meio de cultura não trouxe mudanças no fenótipo dos calos, concordando com DUBLIN (1981) que obteve diferentes fenótipos de calos com diferentes concentrações de 2,4-D e afirma que o fenótipo depende do nível de auxina usado. Estes dados contrariam SONDAHL & SHARP (1977a) os quais afirmam a necessidade de um

mínimo de cinetina (0.11mg/l) para a produção e SHARP et alii (1973) que usou como fonte de citocinina, o leite de coco a 5%.

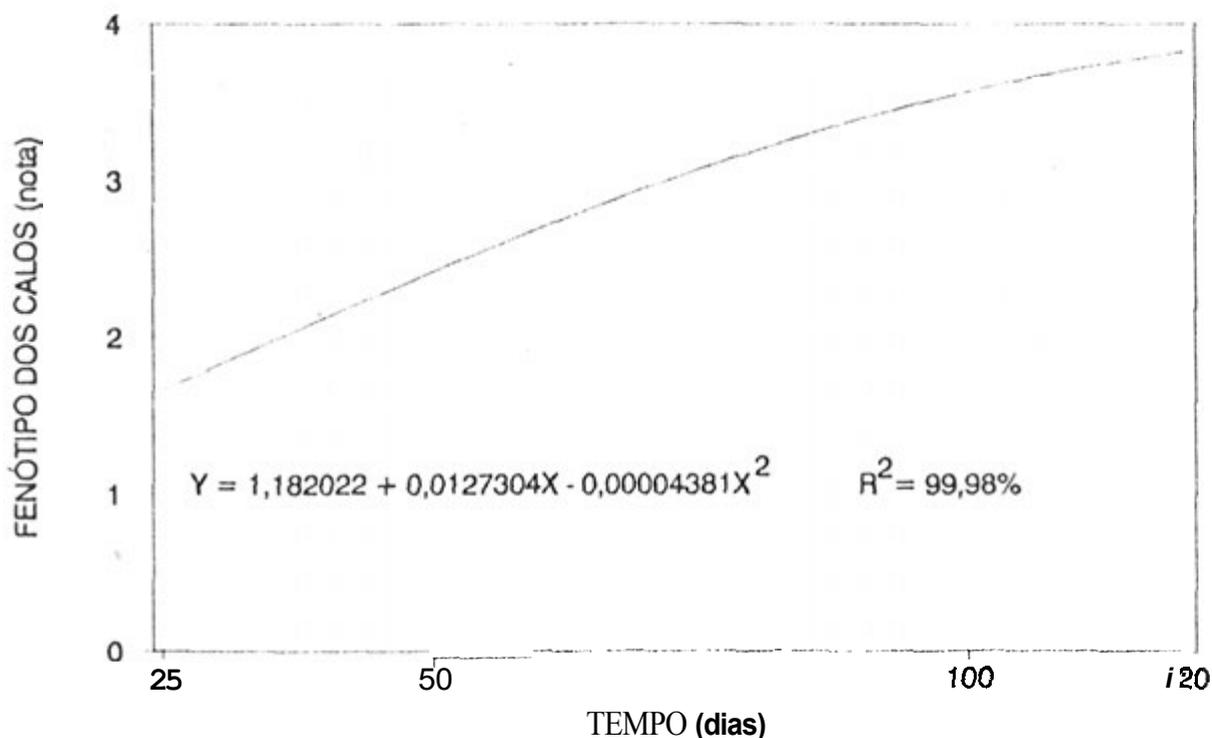


FIGURA 26. Efeito dos tempos de análise sobre o fenótipo dos calos em *Coffea arabica* L. cv Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Para os diferentes níveis de 2,4-D, pode-se afirmar que para a obtenção do fenótipo branco em maior proporção, usou-se 5,45mg/l de 2,4-D, o mesmo nível indicado para a maior proliferação de calos de tamanho muito grande, contrariando SONDAHL et alii (1981), que indicam a concentração ótima para a indução de 0,78mg/l de 2,4-D (Figura 27).

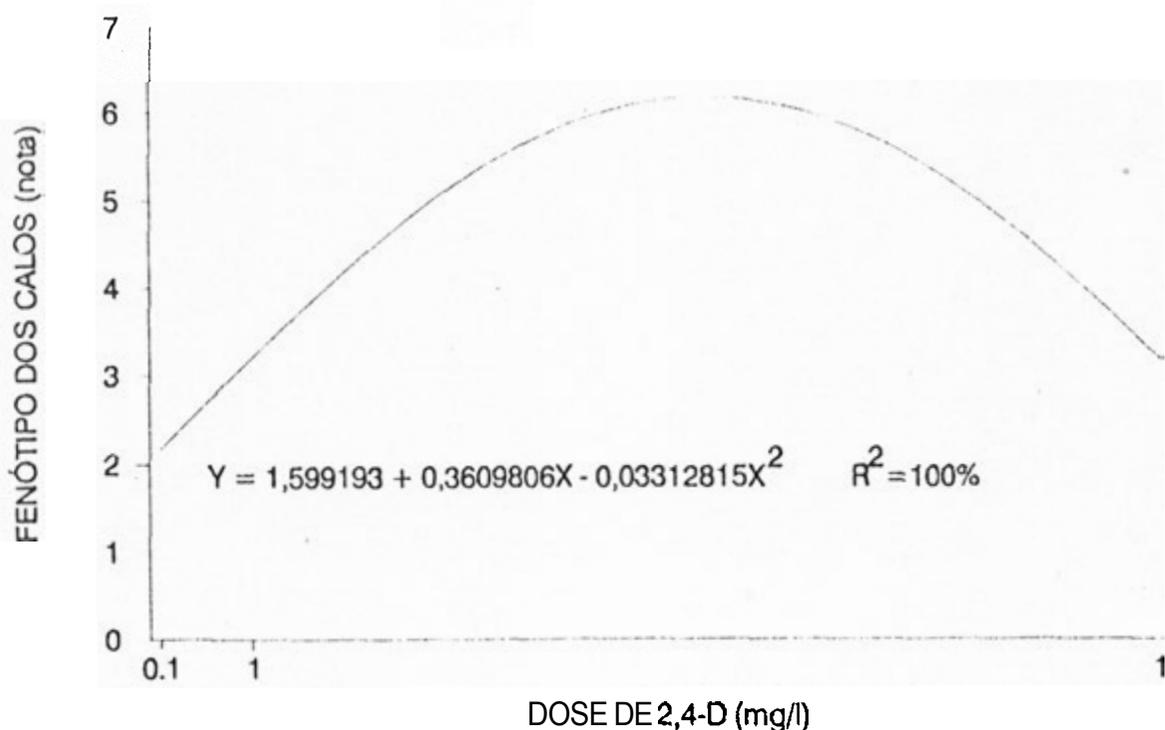


FIGURA 27. Efeito dos níveis de 2,4-D sobre o fenótipo dos calos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Não foram obtidos fenótipos como bolha verde, que são calos com coloração esverdeada, observados por BANDEL et alii (1975) e CARVALHO et alii (1976), e por isso não entraram no sistema de notas. Com certeza não foram produzidos calos com coloração esverdeada por os calos terem sido incubados, durante os quatro meses, no escuro.

## 5. CONCLUSÕES

Para as condições em que **os** experimentos foram realizados, pode-se concluir que:

### Experimento 1

- Para a produção de brotos, **os** componentes do meio "**MS**" devem ser usados integralmente e acrescido de 6,29mg/l de BAP quando se faz repicagens aos **90** dias. Se as repicagens forem feitas aos **120** dias, a concentração de BAP deve ser de a **9mg/l**;
- Para a produção de folhas, **os** componentes do meio "**MS**" devem ser usados integralmente e acrescidos de 6,17mg/l de BAP quando se faz repicagens aos 90 dias. Se as repicagens forem feitas aos **120** dias, a concentração de BAP deve ser elevada a 9mg/l;
- Para a produção de brotos com mais de 1cm ou obtenção da melhor coloração **os** diferentes níveis dos componentes de "**MS**" e BAP não produziam diferenças significativas;
- O maior peso de matéria seca dos brotos foi obtido com o uso dos componentes do meio "**MS**" usados em 75% das suas concentrações acrescidos de 9mg/l de BAP;

- Na ausência de BAP o período de tempo não interfere na produção de brotos e folhas.
- Para qualquer concentração utilizada de BAP ou na ausência da citocinina, 120 dias é o melhor período para a proliferação de brotos e folhas.

### Experimento 2

- Para a produção de brotos e folhas, o melhor nível de BAP é de 5,05mg/l com explantes contendo 2 pares de gemas;
- Para a produção de brotos com mais de 1cm ou matéria seca ou obtenção da melhor coloração, a associação ideal é de 9mg/l de BAP e explantes com 3 pares de gemas;
- Para qualquer concentração utilizada de BAP ou na ausência desta citocinina, 120 dias é o melhor período para a proliferação de brotos e folhas.

### Experimento 3

- Para a produção de calos de maior tamanho, considerando-se 25 dias após a inoculação, a melhor concentração de 2,4-D, é de 5,43mg/l;
- O período que se observa a maior proliferação de calos, para todas as concentrações de 2,4-D este entre 88 e 89 dias;
- Para a obtenção do melhor fenótipo dos calos, a concentração ideal de 2,4-D é de 5,45mg/l;
- A cinetina, em todos os níveis estudados, não mostrou ser importante ou essencial na indução ou proliferação de calos de Catuaí.

## 6. SUGESTÕES

No experimento 2, sugere-se utilizar explantes contendo folhas inteiras e também reduzidas à metade em comparação com explantes sem folhas.

Também pode-se experimentar o tipo de inoculação vertical ou horizontal.

No experimento 3, sugere-se usar níveis de 2,4-D entre 1,0 e 10,0mg/l, a fim de comprovar ou não os dados obtidos pelas derivações das equações.

## 7. RESUMO

Os experimentos foram realizados no laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL - Lavras, MG. O material vegetal utilizado foi café *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44, cujas plântulas já estavam estabelecidas "in vitro" com cerca de 6 meses de idade. Para os trabalhos de micropropagação foram usados nós com folhas excisadas, enquanto que para a indução dos calos foram usadas folhas cortadas à metade. O meio de cultura básico foi o "MS" e o agente gelificante foi ágar (7g/l) com pH 5,9 antes da autoclavagem. No primeiro estudo, as concentrações dos componentes de "MS" foram 25%, 50%, 75% e 100% e, níveis de BAP (0, 3, 6 e 9mg/l); no segundo estudo, o tamanho do explante variou em 2, 4 ou 6 gemas e 0, 3, 6 e 9mg/l de BAP; e, no terceiro, os sais de "MS" foram usados na metade de sua concentração e os outros componentes integralmente usados, acrescido de 2g/l de caseína hidrogenada variando os níveis de cinetina (0; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0mg/l) e 2,4-D (0,1; 1,0 e 10mg/l). Para a micropropagação foram avaliados número total de brotos e folhas, aos 30, 60, 90 e 120 dias e, número de brotos maiores que 1cm, cor e peso da matéria seca aos 120 dias, enquanto para a indução de calos foram avaliados por

sistema de notas para tamanho e fenótipo dos calos aos 25, 50, 100 e 120 dias. O delineamento experimental foi DTC e quando havia avaliações em diferentes tempos, o Parcela subdividida no tempo. Para o experimento testando diferentes níveis de componentes de "MS" e BAP, a produção de brotos é maior no uso do "MS" usado integralmente na presença de 6,29mg/l de BAP quando avaliados aos 90 dias e, 9mg/l de BAP, quando as análises foram feitas aos 120 dias. Para a produção de folhas, 6,17mg/l de BAP quando avaliados aos 90 dias e 9,0mg/l, aos 120 dias, com "MS" integral. Na variável peso da matéria seca, os componentes de "MS" usados em 75% das suas concentrações e 9,0mg/l de BAP apresentaram o melhor resultado. Para número de gemas e níveis de BAP, a produção de brotos e folhas é melhor com 5,05mg/l de BAP e explantes com 2 pares de gemas, enquanto que para os outros parâmetros avaliados, os melhores resultados foram conseguidos com 9,0mg/l de BAP e explantes com 3 pares de gemas. Na indução de calos para o parâmetro tamanho como para fenótipo, o nível de 2,4-D que produz melhores resultados é de 5,4mg/l enquanto a cinetina não mostrou efeito na produção de calos em nenhuma concentração estudada. O melhor tempo de crescimento dos calos, para todos os níveis de 2,4-D, esteve entre 88 e 89 dias.

## 8. SUMMARY

The studies were realized at the tissue culture laboratory at ESAL - Lavras, MG. The vegetable material used was coffee - *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho CH 2077-2-5-44, wích seedlings were already established "in vitro"aged 6 months. for the micropropagation stídies it was used nos with excised leaves and for the callus induction, were used leaves cutted on half. The basic culture medium was the "MS" and the gelifing agent was the **ágar** (7g/l) with pH 5,9 before autoclaving. An the first study, the concentrations of the components of "MS" was 25%, 50%, 75% e 100% and, BAP levels (0, 3, 6 and 9mg/l); on the second study, the size of the explant had among 2, 4 or 6 buds and 0, 3, 6 and 9mg/l of BAP; and on the third, the salts of "MS" was used a half of concentration and the other components were used integrally added 2g/l of hydrolised caseíne changing the levels of kinetin (0; 0,01; 0,1; 1,0 and 10,0mg/l) and 2,4-D (0,1; 1,0 and 10,0mg/l). For the micropropagation, it was assessed the total number of shoots and leaves, on 30, 60, 90 and 120 days, and number of shoots bigger than 1cm, color and weight of dried material on 120 days; while for the callus induction it were for the system of notes for size and fenotípe of the callus

at 25, 50, 100 and 120 days. The experimental delineation was DIC, and when there was evaluation on different times, split plot in time. For the experiment testing different level of "MS" and BAP components the production of shoots is better using "MS" integrally, on presence of 6,29mg/l of BAP when evaluated on 90 days and, 9,0mg/l of BAP when the analysis were done on 120 days, with integral "MS". On the variable dried material weight, the "MS" components used in 75% of its concentrations and 9,0mg/l of BAP show the best results. For the number of buds and BAP levels, the production of shoots and leaves is better with 5,05mg/l of BAP and explants with 2 pairs of buds, while for the other evaluated parameters, the better results gotten with 9,0mg/l of BAP and explants with 3 pairs of buds. On the callus induction, for the parameter size, as the phenotype, the level of 2,4-D that products better results is 5,4mg/l while the kinetin didn't show effect in the production of callus in any concentration studied. The best callus growing period, for all 2,4-D levels, was among 88 and 89 days.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRE, M. Observations sur L'orthotropisme est le plagiotropisme des rameaux chez *Coffea arabica* L. *Café, Cacao, Thé*, Paris, 27(2):125-8, avr/jul. 1983.
2. BANDEL, G.; CARVALHO, F.J.P.C.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; GUTIERREZ, L.E. & CARVALHO, P.C.T Aspectos citológicos da diferenciação de tecidos de cafeeiros cultivados "in vitro". *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 32:717-24, 1975.
3. BARROS, I. & PASQUAL, M. Ação de fitohormônios na indução e **elongação** de brotações micropropagadas de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, Maringá, 1989. Resumos... Rio de Janeiro, MIC/IBC, 1989a. p.186.

4. BARROS, I. & PASQUAL, M. Efeito da citocinina 6-BA na micropropagado de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 15, Maringá, 1989. Resumos... Rio de Janeiro, MIC/IBC, 1989b, p.56-7,
5. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Efeito de citocinina e giberilina no cultivo "in vitro" de segmentos nodais de *Coffea arabica* cv. Catuaí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, '16, Espírito Santo do Pinhal, 1990. Resumos.. Rio de Janeiro', MIC/IBC, 1990. p.11.
6. BAUMANN, T. W. & NEUENSCHWANDER, B. Tissue Culture in Coffee Biotechnology. *Café, Cacao, Thé*, Paris, 34(2):159-64, avr/jul. 1990,
7. BERTHOULY, M. & ECHEVERRI, J.H. Multiplicación asexual de diferentes líneas de catimores: indución "in vitro" de yemas axilares latentes. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE TECNOLOGIA CAFEIRA, 1, Campinas, 1987. Resumos.. Rio de Janeiro, MIC/IBC, 1987. p.279-83.
8. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.C., eds, *Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília, 1990, p.37-70.

9. CAMBRONY, H.D. & SNOECK, J. Hormones et régulateurs de croissance dans les cultures de caféiers et de cacaoyers. *Café, Cacao, Thé, Paris*, 27(2):113-9, avr/jui. **1.303.**
10. CARVALHO, F.J.P. C.; CARVALHO, P.C.T. & CROCOMO, O.J. Cultura de Tecidos de explantes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 2, Poços de Caldas, 1974. Resumos... Rio de Janeiro, 1974. p.299-300.
11. CARVALHO, F.J.P.C.; CROCOMO, O.J.; BANDEL, G.; SHARP, W.R.; GUTIERREZ, L.E. & CARVALHO, P.C.T. de. Metodologia, controle hormonal e citologia de diferenciação celular de tecidos de *C. arabica* L. cultivado "in vitro". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 4, Caxambu, 1976. Resumos... Rio de Janeiro, 1976. p.32-3.
12. CEBALHOS, J. Significado y origem de la palabra café. *El café mexicano, México*, (4):49, abr. 1974.
13. COCKING, E.C. & RILEY, R. Applications of Tissue Culture and Somatic Hybridization to Plant Improvement. In: FREY, K.J., ed. *Plant breeding*. Ames, the Iowa State University Press, 1981. p.85-116.

14. CROCOMO, O.J.C., CARVALHO, P.C.T. de, SHARP, W.R. & BANDEL, G. Controle hormonal da diferenciação de tecido da café cultivado "in vitro". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26, Rio de Janeiro, 1975. Resumos... Rio de Janeiro, 1975. p.175.
15. CUSTER, J.B.M.; VAN E, G. & BUIJS, L.C. Clonal propagation of *Coffea arabica* by nodal culture. In: INTERNATIONAL SCIENCE COLLOQUIUM ON COFFEE, 9, Londres, 1980. Paris, ASIC, 1980, v. 2, p. 586-96.
16. DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. *Café, Cacao, Thé*, Paris, 25(4):234- 42, oct/déc. 1981.
17. \_\_\_\_\_. Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique. *Café, Cacao, Thé*, Paris 24(2):121-30, avr/jui. 1980a.
18. \_\_\_\_\_. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N.M. & MROGINSKI, L.A., eds. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura., Fundamentos e Aplicaciones..* Turrialba, 1991. p.621- 42.
19. \_\_\_\_\_. Multiplication végétative "in vitro" de L'arabusta. *Café, Cacao, Thé*, Paris, 24(4):281-90, oct/déc. 1980b.

20. DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao, Thé*, Paris, 28(4):231-44, oct/déc. 1984.
21. FERREIRA, J.H. Cultura de Tecidos no melhoramento de café (*Coffea* spp). Piracicaba, 1979. 53p.
22. GUEVARA, E.B. Métodos y medios de cultivo. In: **II Curso** de Cultivo de Tejidos. Turrialba, Costa Rica, 1987a. p.22-57.
23. \_\_\_\_\_. Reguladores de Crecimiento. In: **II Curso de Cultivo de Tejidos**. Turrialba, Costa Rica, 1987b. p.58-79.
24. GUZMAN, N. & BERTHOULY, M. Multiplicación vegetativa de café (*Coffea* spp.) por microestacas. In: **II Curso** de Cultivo de Tejidos. Turrialba, Costa Rica, 1987. p.80-6.
25. HREMAN, E.B. & HASS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, Virginia, 10(6):588-9, Dec. 1975.
26. KRİKORIAN, A.D.; KELLY, K. & SMITH, D.L. Hormones in Tissue Culture and micropropagation. In: DAVIES, P.J., ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. New York, 1987. p.593-613.

27. LEON, J. Fundamentos botânicos de los cultivos tropicales. Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 1968. p.229-30. (Série Textos y Materiales de Enseñanza, 18).
28. LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 18:100-27, 1965.
29. LONDOÑO, M.E.A. de: PIZZINI, W.R. & RODRIGUEZ, J. Cultivo de meristemas de café. *Cenicafé*, Colômbia, 38(3):106-11, jul/sep. 1981.
30. MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; SONDAHL, M.R.; FAZUOLI, L.C. & COSTA, W.M. Coffee breeding and related aspects. In: JANICK, J. *Plant Breeding Reviews*. Westport, Connecticut, 1983, p.157-94.
31. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review Plant Physiology, California*, 25:135-66, 1974.
32. \_\_\_\_\_ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.

33. NAKAMURA, T. & SONDAHL, M.R. Micropropagação de cafeeiros.  
In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10., Poços de Caldas, 1983. Resumos... Rio de Janeiro, 1983. p.116-7.
34. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Multiplicação "in vitro" de gemas ortotrópicas em *Coffea* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 9, São Lourenço, 1981. Resumos... Rio de Janeiro, IBC, 1981. p.162-3.
35. NASSUTH, A.; WORMER, T. M.; SOUMAN, F. & STARITSKY, G. The histogenesis of callus in *coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. *Acta Botanica Neerlandica, Netherlands*, 29(1):49-54, Feb. 1980.
36. PASQUAL, M. & PINTO, J.E.B.P. Melhoramento de cafe (*Coffea arabica* L.) através de métodos de cultura de tecidos. Lavras, 1988, 13p.
37. SACHS, T. & THIMANN, K.V. The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany, Columbus*, 54(1):136-44, Jan. 1967.

38. 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*, Buenos Aires, 31(2):67-74, 1973.
39. SONDAHL, M.R. Interações de citocininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes foliares de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAPEEIRAS, 6, 1978. Resumos... Rio de Janeiro, 1978, p.67.
40. \_\_\_\_\_; & LOH, W.H.T. Coffee Biotechnology. In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. *Coffe*. London Agronomy, New York, 1987. v.4, p.235-64.
41. \_\_\_\_\_; MONACO, L.C. & SHARP, W.R. In vitro methods applied to coffee. In: THORPE, T.A., ed. *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. New York, Academic Press, 1981. p.325-47.
42. \_\_\_\_\_ & NAKAMURA, T. Propagação vegetativa "in vitro" de *Coffea* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAPEEIRAS, 8., Campos do Jordão, 1980. Resumos.. Rio de Janeiro, IBC, 1980. p.129.

43. \_\_\_\_\_ ; MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO A. FAZUOLI, L.C. & COSTA, W.R. Coffee. In: AMMYRATO, & McMILLEN, eds. Handbook of plant cell culture. New York, 1984. p.564-90.
44. \_\_\_\_\_ & SHARP, W.R. Propagación "in vitro" del café. In: ROCA, W.R. & MROGINSKI, L.A., eds. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos e Aplicaciones. Turrialba, 1991. p.621-42.
45. \_\_\_\_\_ & SHARP, W.R. Growth and embryogenesis in leaf tissues of *coffee*. Plant Physiology, Washington, **59(6):1**, Aug. 1977a.
46. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie, Zurich, **81(4):395-408**, 1977b.
47. SONDAHL, M.R.; SPAHLINER, 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 Pflanzenphysiologie, Zurich, **94(2):101-8**, 1979.
48. STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissue of coffee. Acta Botanica Neerlandica, Netherlands, **19(4):509-14**, Aug. 1970.

49. THORPE, A.T. & PATEL, K.R. Clonal propagation: Adventitious Buds. In: VASIL, I.K., ed. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Orlando, 1984. p.49-60.
50. YASUDA, T. FUJI, Y.. & YAMAGUCHI, T. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* leaf explants by Benzyladenine. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 26(3):595-7, apr. 1985.
51. ZOK, S. & DUBLIN, P. Multiplication vegetative "in vitro" par culture d'apex chez *Coffea arabica* L.: action de solutions minerales et de regulateurs de croissance. Café, Cacao, Thé, Paris, 35(4):245-56, oct/déc. 1991.