

CUSTO DE PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE CAFÉ ARÁBICA PRODUZIDAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA¹

Carlos Henrique Siqueira de Carvalho²; Ana Carolina SR Paiva³, Danielle Silva Souza⁴, Elizani Quintino Silva⁵, Aline Aparecida Custódio⁶, Paloma Bequima Borato⁷, Gabriella Alves Marçal⁸, Bruna Nascimento Marques⁹

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café, FAPEMIG e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT-Café.

²Pesquisador, PhD, Embrapa Café/Fundação Procafé, Varginha-MG, carlos.carvalho@embrapa.br

³Pesquisadora, Bela, Fundação Procafé, Varginha-MG, carolramia@hotmail.com

⁴Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, daniellevga@hotmail.com

^{5,6}Bolsistas do Consórcio Pesquisa Café, contato@fundacaoprocafe.com.br

⁷Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, pyloma@hotmail.com

⁸Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, gabialves_vga@hotmail.com

⁹Bolsista do INCT-Café, marquesbiomedicina@outlook.com

RESUMO: A produção de mudas clonais de café pode ser feita de diferentes formas. Entretanto, a produção por embriogênese somática é a que tem despontado como a mais promissora. A embriogênese somática permite a produção de mudas em larga escala a partir de folhas usadas como explantes. Plantas obtidas por esse processo apresentam comportamento semelhante ao de plantas oriundas de sementes, não havendo limitação para a sua utilização comercial. A produção de mudas clonais de café é realizada em laboratórios de cultura de tecidos adaptados para a produção em escala industrial, denominados de biofábricas. Todavia, a produção de mudas clonais via embriogênese somática é uma técnica que ainda não foi explorada comercialmente no Brasil e não existe uma estimativa do custo de produção de mudas clonais de café arábica. Assim, o objetivo no presente trabalho foi calcular o custo de produção de mudas clonais de café em uma biofábrica de pequeno porte, tendo-se como base o protocolo desenvolvido pela Fundação Procafé/Embrapa Café, com a colaboração de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento, CIRAD, França. Este trabalho apresenta também uma relação dos equipamentos e materiais necessários para a produção de mudas de café in vitro. O custo de produção de uma muda foi de R\$0,97 para uma produção anual de 400.000 mudas, utilizando-se o plantio de embriões pré-germinados diretamente em tubetes. Caso a etapa de produção de plântulas em potes in vitro seja utilizada, o custo de produção passa a ser de R\$1,34.

PALAVRAS-CHAVES: propagação vegetativa, propagação in vitro, mudas clonais.

PRODUCTION COST OF CLONAL ARABIC COFFEE PLANTAS PRODUCED BY SOMATIC EMBRYOGENESIS

ABSTRACT: The production of clonal coffee can be done in different ways. However, production by somatic embryogenesis is what has emerged as the most promising. Somatic embryogenesis allows plant production on a large scale from leaves used as explants. Plants obtained by this process exhibit similar behavior to that of plants grown from seeds, with no limitation for its commercial use. The production of clonal coffee is carried out tissue culture laboratory adapted for industrial scale production. However, the production of coffee plants via somatic embryogenesis is a technique that has not been commercially exploited in Brazil and there is no estimate of the production cost. The objective of the present work was to calculate the cost of production of clonal coffee in a small commercial tissue culture laboratory, taking as basis the protocol developed by the Procafé Foundation / Embrapa Café, in collaboration with researchers of Embrapa Genetic Resources and biotechnology and Center for International Cooperation in Agronomic Research for Development, CIRAD, France. This paper also presents a list of the equipment and materials necessary for the production of coffee plants in vitro. The production cost of a plant was US\$0.50 for an annual production of 400.000 plants, by using direct sowing of pre-germinated embryos directly into tubes. If the embryos go through an in vitro phase before the nursery stage, then the production cost is R \$ 0.70.

KEY WORDS: vegetative propagation, in vitro propagation, clonal plants.

INTRODUÇÃO

A produção de mudas clonais de café pode ser feita de diferentes formas. Entretanto, a produção por embriogênese somática é a que tem despontado como a mais promissora. A embriogênese somática permite a produção de mudas em larga escala a partir de folhas usadas como explantes. Plantas obtidas por esse processo apresentam comportamento semelhante ao de plantas oriundas de sementes, não havendo limitação para a sua utilização comercial (Ducos et al., 2000; Etienne et al., 2001; Carvalho et al., 2011). A produção de mudas clonais de café é realizada em laboratórios

de cultura de tecidos adaptados para a produção em escala industrial, denominados de biofábricas. As biofábricas podem produzir mudas prontas para plantio ou se especializar apenas na etapa *in vitro*, ou seja, na produção de embriões pré-germinados ou de plântulas e terceirizar as fases de aclimatização dos embriões ou plântulas e acabamento das mudas para viveiristas especializados. Os viveiros poderiam se localizar mais próximos às regiões de produtores de café, reduzindo o custo do transporte. Todavia, a produção de mudas clonais via embriogênese somática é uma técnica que ainda não foi explorada comercialmente no Brasil e não existe uma estimativa do custo de produção de mudas clonais de café arábica. Assim, o objetivo no presente trabalho foi calcular o custo de produção de mudas clonais de café em uma biofábrica de pequeno porte, tendo-se como base o protocolo desenvolvido pela Fundação Procafé/Embrapa Café, com a colaboração de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento, CIRAD, França. Este trabalho apresenta também uma relação dos equipamentos e materiais necessários para a produção de mudas de café *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O custo de produção foi baseado no seguinte processo de produção de mudas clonais: 1) Indução de calos: inicia-se com a coleta de folhas das plantas matrizes, as quais são levadas para a biofábrica, onde é feita a desinfestação e plaqueamento de explantes em placas de Petri, objetivando a obtenção de calos embriogênicos. Essa etapa tem duração de cinco a seis meses. 2) Crescimento dos calos embriogênicos: nessa fase os calos são multiplicados em Erlenmeyers com meio de cultura líquido por um período de 45 a 60 dias. 3) Regeneração de embriões globulares: após a fase de multiplicação, os calos são colocados novamente em placas de Petri para a regeneração de embriões globulares. A formação dos embriões globulares requer de dois a quatro meses. 4) Maturação de embriões em biorreator: os embriões globulares são então transferidos para biorreatores de imersão temporária, para desenvolvimento e maturação, por um período de três a quatro meses. Ao final dessa fase, são obtidos cerca de 500 a 700 embriões em estágio cotiledonar, pré-germinados, por biorreator. Os biorreatores podem ser do tipo RITA ou de frascos gêmeos, com capacidade de dois a quatro litros. 5) Formação de plântulas: os embriões pré-germinados podem seguir duas rotas: a) com formação de plântulas *in vitro* (em potes de plástico): nesse caso os embriões pré-germinados produzidos nos biorreatores são transferidos para potes de plástico com meio de cultura, onde permanecem por dois meses ou até que plântulas com dois a três pares de folhas sejam formadas. Essa fase dura de dois a três meses. b) plantio de embriões pré-germinados produzidos nos biorreatores diretamente em bandejas com substrato orgânico: os embriões são plantados em bandejas com substrato orgânico comercial, aclimatizados em casa de vegetação até que as plântulas formadas atinjam três pares de folhas e então transferidos para tubetes ou sacolas plásticas e levados para um viveiro para o acabamento das mudas. Duração: quatro a cinco meses. 6) Acabamento das mudas: as plântulas oriundas de potes de plástico ou de bandejas são transplantadas para tubetes ou sacolas plásticas com substrato para mudas de café, colocadas em uma estufa onde permanecem até que estejam adaptadas à nova condição e, a seguir, levadas para um viveiro, onde será feito o acabamento das mudas. Essa etapa tem duração de quatro a cinco meses. Todo o processo, desde o plaqueamento dos explantes foliares até o momento em que a muda está pronta para o plantio, requer de 22 a 24 meses. O custo de produção das mudas foi calculado para uma biofábrica de pequeno porte com capacidade inicial de produção de 400.000 mudas por ano. A Tabela 1 contém os coeficientes técnicos utilizados para a produção de 400.000 mudas e a Tabela 2 a relação de todos os equipamentos e materiais necessários para o funcionamento da biofábrica, bem como a durabilidade e o valor unitário. Para o cálculo do custo, considerou-se também a depreciação anual dos equipamentos e materiais. Os valores em reais foram obtidos em novembro de 2012. Considerou-se que a biofábrica necessita de seis técnicos de laboratório e um gerente em tempo integral (Tabela 3). A etapa final de acabamento das mudas em viveiro foi terceirizada a um custo de R\$0,40 por muda. A planilha de distribuição dos custos foi dividida em três categorias: 1) custos diretos: são os custos das operações de cultivo *in vitro* realizados dentro da biofábrica, mais o valor pago para o acabamento das mudas mediante a contratação de um viveirista especializado nessa etapa. 2) reposição: inclui o custo de aquisição dos equipamentos, instrumental, vidraria, reagentes e produtos diversos, bem como a vida útil e o custo de reposição. 3) diversos: despesas com a manutenção da biofábrica, pagamento de pessoal (técnicos e gerente), água e energia elétrica.

Tabela 1. Coeficientes técnicos para a produção de 400.000 mudas clonais de café

Especificação	Unid.	Qtd	Coeficientes
Etapa 1: Indução de calos.			<ul style="list-style-type: none"> • Esta fase inclui a desinfestação de folhas, plaqueamento dos explantes e o primeiro subcultivo dos explantes. Duração: 5-6 meses.
Folhas	U	864	<ul style="list-style-type: none"> • 01 folha = 40 explantes • 9 explantes/placa • 30 placas/litro de meio • Taxa de contaminação de explantes = 30% • Taxa de indução de calos = 30% • 40 mg de calo/ explante
Explantes plaqueados	U	34.560	
Explantes úteis	U	24.192	
Explantes com calo embriogênico	U	7.258	
Produção de calos embriogênicos	mg	290.320	

Etapa 2. Crescimento dos calos embriogênicos			• Multiplicação de calos em meio líquido com Erlenmeyer. Duração: 45 a 60 dias.
Quantidade calo no início cresc.	mg	290.320	• 400 mg de calo/Erlen. Período de cresc.: 45 dias
Quantidade de calo ao final	mg	1.233.860	• Perda de 15% por contaminação • Aumento da massa dos calos: 5X
Etapa 3: Regeneração de embriões globulares			• Etapa realizada em placas de Petri. Duração: 2 a 4 meses.
Número de embriões globulares	U	1.233.860	• 900 mg de calo/Placa de Petri • 1-5 embriões/mg de calo
Etapa 4. Maturação dos embriões em biorreatores RITA			Duração: 3 a 4 meses.
Número de embriões pré-germinados produzidos	U	1.240.000	• 300 mg de embriões globulares/calos = 500 a 700 embriões pré-germinados/ RITA
Etapa 5. Formação de plântulas.			• Nesta etapa existem duas opções: 5a/5b e 6a/6b.
Alternativa A: formação de plântulas diretamente em bandejas com substrato orgânico comercial			• O embrião pré-germinado é transferido diretamente para tubete ou sacola em casa de vegetação. Duração: 3-4 meses
Produção de plântulas em bandejas com substrato orgânico comercial	U	496.000	• Taxa de conversão de embrião pré-germinado para plântula em bandeja = 40%
Alternativa B: formação de plântulas em potes <i>in vitro</i>.			• As plântulas são formadas <i>in vitro</i> . Esta opção é mais onerosa. Duração: 2 a 3 meses
Plântulas formadas	U	682.000	• Taxa de conversão de embrião pré-germinado para plântula em pote <i>in vitro</i> = 50%
Etapa 6. Acabamento das mudas.			• Duração: 3-5 meses
Mudas prontas para plantio	U	400.000	• Taxa de conversão de plântula/muda = 70 a 80%

Tabela 2. Relação dos principais equipamentos e materiais, quantidade, valor unitário, valor total e durabilidade utilizados para calcular o custo de produção de mudas

Item	Descrição	Desc.	Qtd	Valor unitário	Valor total	Durab. (anos)
1	Agitador (Corning [®])	equip.	1	450,00	450,00	15
2	Lupa (Tecnival [®])	mat.	1	1.543,00	1.543,00	30
3	Balança B3002 (COLLEGE [®])	equip.	1	3.124,00	3.124,00	20
4	Agitador magnético (ONDA [®])	equip.	1	1.044,00	1.044,00	15
5	Microondas 18 litros (Electrolux [®])	equip.	1	400,00	400,00	15
6	Barrilete 50 litros	equip.	1	423,00	423,00	40
7	Autoclave vertical (180 L)	equip.	2	4.100,00	8.200,00	25
8	Barrilete de 20 litros	equip.	1	208,00	208,00	40
9	Geladeira (Continental [®] 460 litros)	equip.	2	2.100,00	4.200,00	15
10	Armário de aço	equip.	2	450,00	900,00	40
11	Phmetro Digimed [®]	equip.	1	710,00	710,00	15
12	Ar condicionado Elgin [®]	equip.	1	899,00	899,00	15
13	Carrinho de aço	equip.	1	850,00	850,00	30
14	Carrinho de plástico	equip.	1	675,00	675,00	30
15	Ar Condicionado Gree	equip.	1	899,00	899,00	15
16	Computador	equip.	1	1.200,00	1.200,00	5
17	Impressora	equip.	1	449,00	449,00	5
18	Mesa para computador	equip.	2	150,00	300,00	15
19	Arquivo	equip.	1	440,00	440,00	40
20	Armário de aço (guarda volumes)	equip.	1	410,00	410,00	40
21	Mesas agitadoras Tecnal [®]	equip.	3	4.299,00	12.897,00	10
22	Mesas agitadoras Inova 2300	equip.	3	18.800,00	56.400,00	25
23	Mesa agitadora G10 Gytratory Shaker [®]	equip.	1	5.500,00	5.500,00	15

24	Prateleira de aço	equip.	4	210,00	840,00	40
25	Springer Maxiflex® (cont. de temp.)	equip.	2	1.200,00	2.400,00	15
26	Insuflador de ar	equip.	1	1.415,00	1.415,00	20
27	Prateleiras c/ 4 repartições	equip.	2	436,00	872,00	40
28	Prateleira c/ 3 repartições	equip.	1	310,00	310,00	40
29	Bancada das mesas agitadoras)	equip.	1	590,00	590,00	40
30	Capela de fluxo laminar (Filtracon®)	equip.	1	10.100,00	10.100,00	30
31	Capela de fluxo laminar Pachane 230®)	equip.	1	11.200,00	11.200,00	30
32	Capela de fluxo laminar (Pachane®)	equip.	1	1.000,00	1.000,00	30
33	Capela de fluxo laminar (Veco®)	equip.	1	1.450,00	1.450,00	30
34	Ar condicionado da Gree®	equip.	1	1.200,00	1.200,00	15
35	Ventokit®	equip.	1	420,00	420,00	30
36	Esterilizador Filtracon®	equip.	2	1.450,00	2.900,00	10
37	Esterilizador Marconi®	equip.	1	1.320,00	1.320,00	10
38	Carrinho de inox	equip.	1	675,00	675,00	40
39	Biorreatores (Rita®)	equip.	1000	210,00	210.000,00	6
40	Unidade filtrante Millex®	equip.	500	10,00	5.000,00	3
41	Compressor	equip.	1	2.100,00	2.100,00	25
42	Mangueiras transparentes para rita 0,8 cm	mat.	1,5	16,00	24,00	15
43	Mangueiras transparentes para rita 0,5 cm	mat.	15	11,20	163,41	5
44	Mangueira azul	mat.	19	7,00	131,25	20
45	Painel com timers	equip.	1	2.200,00	2.200,00	25
46	Painel controle da luz	equip.	1	350,00	350,00	15
47	Lâmpada fluorescente 60 cm (20W)	mat.	32	20,00	640,00	3
48	Lâmpada fluorescente Golden®	mat.	92	11,00	1.012,00	3
49	Válvulas solenóides	equip.	6	80,00	480,00	8
50	Conexão preta	mat.	356	2,20	783,20	20
51	Deionizador de água	equip.	1	20.000,00	20.000,00	30
52	Suporte p/ 96 ponteiras (200 µl)	equip.	2	8,20	16,40	15
53	Suporte p/ 100 ponteiras (1,0 ml)	equip.	1	8,20	8,20	15
54	Suporte p/ 54 ponteiras (1,0 ml)	equip.	2	5,00	10,00	15
55	Materiais diversos, reagentes, vidraria e produtos de limpeza e assepsia.				36.373,62	
	TOTAL				418.205,08	

Obs.: Para os materiais incluídos no item 55 considerou-se uma reposição de 10% a cada três anos, ou o mesmo que uma durabilidade de 30 anos. Alguns materiais são consumidos em menos de um ano.

Fonte: elaborado pelos autores.

Tabela 3. Necessidade de pessoal e salários com os encargos sociais

Pessoal	Quantidade	R\$/pessoa/mês	R\$/mês	R\$/ano
Técnicos de laboratório	6	1.400,00	8.400,00	100.800,00
Gerente	1	2.500,00	2.500,00	30.000,00

Fonte: elaborado pelos autores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O custo de produção de uma muda foi de R\$0,97 para uma produção anual de 400.000 mudas, utilizando-se o plantio de embriões diretamente em tubetes (Tabela 2). Caso a etapa de produção de plântulas em potes *in vitro* seja utilizada, o custo de produção passa a ser de R\$1,34 (Tabela 3). A etapa de produção de plântulas *in vitro* foi a de maior custo de todo o processo, sendo responsável por quase 30% do custo total (Tabela 3). Isso ocorre porque em cada pote são produzidas somente 20 plântulas. Devido ao custo mais elevado, essa etapa só deve ser utilizada caso não haja

instalações adequadas (casa de vegetação ou túnel com controle de umidade relativa do ar) para a aclimatização de embriões pré-germinados diretamente em tubetes ou sacolas plásticas. Apesar do custo mais elevado, a produção de mudas com a etapa de produção de plântulas *in vitro* é usualmente realizada por laboratórios de cultura de tecidos que visam à multiplicação de clones para fins experimentais. O acabamento da mudas em viveiro, uma etapa terceirizada, representou 41,1% do custo total da muda, e a parte da produção *in vitro*, 58,9% (Tabela 2). Os biorreatores do tipo RITA representam uma parcela considerável do custo de reposição dos equipamentos. Isso ocorre, porque embora os biorreatores RITA sejam bastante eficientes para o crescimento e maturação dos embriões, devido ao seu pequeno volume de apenas um litro, são produzidos somente 500 a 700 embriões por biorreator. Caso sejam utilizados biorreatores de frascos gêmeos com volume de dois a quatro litros, pode-se aumentar consideravelmente a produção de embriões por biorreator com consequente redução do custo de produção.

Tabela 2. Custo de produção de 400.000 mudas clonais de café com o plantio dos embriões diretamente em bandejas com substrato comercial

ETAPA	CUSTO UNITÁRIO (R\$/muda)	TOTAL (R\$)	PARTICIPAÇÃO (%)
Custos Diretos	0,49	196.513,58	50,5
Indução de calos	0,02	7.324,74	1,9
Crescimento de calos	0,00	807,48	0,2
Regeneração de embriões	0,01	2.228,24	0,6
Maturação de embriões	0,07	26.153,12	6,7
Acabamento das mudas	0,40	160.000,00	41,1
Reposição	0,12	48.108,08	12,4
Equipamento	0,11	44.662,42	11,5
Material	0,01	3.445,65	0,9
Diversos	0,36	144.560,00	37,1
Manutenção	0,01	2.360,00	0,6
Energia elétrica	0,02	9.000,00	2,3
Água	0,01	2.400,00	0,6
Técnicos de laboratório	0,25	100.800,00	25,9
Gerente	0,08	30.000,00	7,7
Total geral	0,97	389.181,66	100,0

Fonte: elaborado pelos autores.

Tabela 3. Custo de produção de 400.000 mudas clonais de café incluindo a etapa de produção de plântulas em potes *in vitro*

ETAPA	CUSTO UNITÁRIO (R\$/muda)	TOTAL (R\$)	PARTICIPAÇÃO (%)
Custos Diretos	0,86	343.997,94	64,1
Indução de calos	0,02	7.324,74	1,4
Crescimento de calos	0,00	807,48	0,2
Regeneração de embriões	0,01	2.228,24	0,4
Maturação de embriões	0,07	26.153,12	4,9
Produção de plântulas <i>in vitro</i>	0,37	147.484,36	27,5
Formação de mudas	0,40	160.000,00	29,8
Reposição	0,12	48.108,08	9,0
Equipamento	0,11	44.662,42	8,3
Material	0,01	3.445,65	0,6
Diversos	0,36	144.560,00	26,9
Manutenção	0,01	2.360,00	0,4
Energia elétrica	0,02	9.000,00	1,7
Água	0,01	2.400,00	0,4
Técnicos de laboratório	0,25	100.800,00	18,8

Gerente	0,08	30.000,00	5,6
Total geral	1,34	536.666,02	100,0

Fonte: elaborado pelos autores.

Uma biofábrica de produção de mudas de café para a produção de 400.000 mudas por ano deve contar permanentemente em seu quadro de empregados com seis técnicos de laboratório e um gerente. A época de maior demanda de mudas estende-se de outubro a março e, conseqüentemente, as operações que mais necessitam de mão de obra concentram-se em determinadas épocas do ano. Assim, para a melhor aproveitamento da mão de obra e infraestrutura, é interessante que a biofábrica se dedique também a produzir mudas de outras espécies, como banana, morango, abacaxi e ornamentais. Atualmente o preço de venda de uma muda formada por semente é de R\$0,40. Caso a margem de lucro de uma muda clonal seja de 40%, o preço da muda clonal será de cerca de R\$1,40, ou seja, três a quatro vezes mais que o preço de uma muda de sementes. Assim, cultivares clonais só serão plantadas por produtores rurais caso tenham grande valor agregado ou características ainda não disponíveis comercialmente e demandadas pelo mercado, como por exemplo, resistência ao bicho-mineiro e a nematoides e bebida diferenciada ou por apresentarem produtividade bem mais elevada que as cultivares tradicionais. Os coeficientes técnicos utilizados para calcular a eficiência do processo de produção foram bastante conservadores, em geral utilizando a taxa de eficiência mais baixa do processo. Assim, certamente o custo de produção comercial deve ser um pouco mais baixo que o calculado. Além disso, o custo de algumas atividades pode ser reduzido com pequenas alterações no processo de produção. Por exemplo, na etapa de indução de calos, o número de explantes pode ser reduzido se após a retirada dos primeiros calos os explantes forem deixados nas placas de Petri ou transferidos para placas com meio fresco, permitindo que os resíduos de calos deixados nas placas possam crescer novamente. Estima-se que esse segundo ciclo de produção possa produzir 60 a 70% da massa de calos produzida no primeiro ciclo. Durante a fase de crescimento dos calos, foi considerado apenas um ciclo de crescimento de calos de 45 dias com um aumento final da massa de calos de cinco vezes. Caso seja realizado um novo ciclo de crescimento de 45 dias, utilizando como inoculo os calos multiplicados no primeiro ciclo, haveria um aumento de massa dos calos de 25 vezes, reduzindo a necessidade do plaqueamento de explantes. A taxa de conversão de calos embriogênicos para embrião globular foi de somente um a dois embriões globulares/mg de calo. Todavia, é comum a obtenção de cinco embriões/mg de calo.

CONCLUSÕES

O custo de produção de uma muda foi de R\$0,97 para uma produção anual de 400.000 mudas, utilizando-se o plantio de embriões diretamente em tubetes. Caso a etapa de produção de plântulas em potes *in vitro* seja utilizada, o custo de produção passa a ser de R\$1,34.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, C. H. S. et al. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro Catuaí Vermelho propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n.4, p.378-383, abr. 2011.
- DUCOS, J. P. et al. A technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: *in vitro* somatic embryogenesis. In: COLLOQUIUM OF INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION, 18., 1999, Helsinky. **Proceedings**. Vevey, Switzerland: ASIC, 2000. p. 295-301.
- ETIENNE, H. et al. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* Trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiology**, v. 21, n. 14, p. 1031-1038, Sept. 2001.
- ETIENNE, H. et al. Biotechnological application for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 2, p. 129-138, Mar./Apr. 2002.