

REGULADORES DE CRESCIMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *COFFEA ARABICA*.

Ana Carolina Ramia Santos², Juliana Costa de Rezende³, Moacir Pasqual⁴, Carlos Henrique Siqueira de Carvalho⁵

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café CBP&D/Café

²Bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café CBP&D/Café carolramia@hotmail.com

³Pesquisadora, D.Sc., EPAMIG, Lavras-MG, julianacosta@epamig.br

⁴Professor Titular do Departamento de Fitotecnia UFLA mpasqual@ufla.br

⁵Pesquisador, D. Sc., Embrapa Café. carlos.carvalho@embrapa.br (✉)

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

Palavras- Chave: café, auxina, citocinina.

GROWTH REGULATION UPON THE *Coffea arabica* SOMATICS EMBRYOS DEVELOPMENT.

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

Key words: coffee, auxin, cytokinin.

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

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

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento. A análise de variância foi realizada utilizando-se o procedimento GLM[□] e, quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos e entre as interações, as médias foram comparadas entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

Os valores relativos à porcentagem de plântulas normais foram transformados por $\arcsen(\sqrt{x})$, por não apresentarem homogeneidade das variâncias.

• Aplicativo computacional SAS[®] (SAS, 1990)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comprimento da parte aérea

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

Na presença de BAP, o comprimento da parte aérea foi estatisticamente igual na presença ou na ausência de IBA e, na ausência de BAP, este comprimento foi estatisticamente superior na ausência de IBA do que na sua presença (Tabela 1). Da mesma forma, na presença de IBA, o comprimento médio das plantas é estatisticamente igual ao comprimento na presença ou na ausência de BAP. Na ausência de IBA, o comprimento foi estatisticamente superior na ausência de BAP.

Tabela 1 Valores médios do comprimento da parte aérea de plantas de *C. arabica*, segundo os tratamentos estudados.

IBA (1,47µM)	BAP (1,33µM)	
	Com	Sem
Com	1,92a A	1,87b A
Sem	1,81a B	2,44a A

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

Verifica-se, ainda na Tabela 1, que houve maior comprimento da parte aérea na ausência de ambos os reguladores de crescimento. Segundo Guerra et al. (1999), o efeito das auxinas no desenvolvimento de embriões somáticos é primariamente inibitório e se manifesta nos estádios subseqüentes ao globular. Isso foi demonstrado pelo trabalho de Newcomb & Wetherell (1970) em cenoura, os quais verificaram que, na presença apenas de 2,4-D, os embriões somáticos se desenvolviam até o estágio de pró-embrião. Desenvolvimento posterior para os estádios globular, cordiforme, cotiledonar e plantas adultas só ocorria em meio desprovido de 2,4-D. Da mesma forma, Raghavan & Torrey (1964) observaram a inibição do crescimento em orquídea com a utilização de citocininas.

Porcentagem de plântulas com raízes

Os efeitos principais da adição de IBA e de BAP ao meio de cultura foram significativos. Observa-se, pelos dados da Tabela 2, que o Tratamento 3, constituído pelo meio PRM acrescido de 1,47µM de IBA, não apresentou formação de sistema radicular, sendo estatisticamente inferior aos demais tratamentos estudados. Os resultados corroboram as observações de Hu & Ferreira (1998), os quais afirmam que reguladores de crescimento não necessitam ser adicionados ao meio de cultura de embriões, exceto quando o objetivo do trabalho é a multiplicação rápida.

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

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

Tabela 2 Valores médios de plantas de *C. arabica* com raízes, segundo os tratamentos estudados.

IBA (1,47µM)	BAP (1,33µM) ¹	
	Com	Sem
Com	0,00 b B	39,44 a A
Sem	42,69 a A	54,64 a A

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

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

Porcentagem de plântulas normais

Cerca de 60% dos embriões cotiledonares colocados nos meios em estudo não se desenvolveram bem, formando plântulas muito pequenas, com baixo desenvolvimento da parte aérea ou plântulas anormais. Esses resultados se aproximam dos de Ducos et al. (2007), os quais obtiveram uma taxa de conversão de embriões somáticos de café robusta em plantas estimada em 46%, após a germinação completa em casa de vegetação. Da mesma forma, Barrueto Cid & Cruz (2002), ao transferirem embriões somáticos de *C. arabica* cv. Rubi, Catuaí Vermelho 81 e Iapar 59 para o meio SP de germinação e crescimento observaram a ausência de desenvolvimento de raiz ou parte aérea. Estes embriões foram caracterizados como anormais, ocorrendo em, aproximadamente, 33% dos casos.

A adição de IBA e de BAP, isoladamente, ou em conjunto, não aumentou a formação de plântulas normais. Na ausência do BAP, houve desenvolvimento de 44,84% de plântulas normais e, na presença deste regulador, esta porcentagem foi de 36,50%. Esta porcentagem foi bastante semelhante quando considerados os níveis de IBA (40,53% e 40,81% de plântulas normais na presença e na ausência do regulador, respectivamente) Dessa forma justifica-se a utilização do meio de cultura sem a adição desses reguladores, com o objetivo de redução dos custos. Vale ressaltar que as plântulas normais obtidas no presente trabalho foram transferidas para casa de vegetação, apresentando desenvolvimento normal e fenótipo idêntico ao de plantas originadas por sementes.

CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L.M. da C.O.; PASQUAL M.; MACIEL, A.L. de R.; PEREIRA, A.B.; CAVALCANTE-ALVES, J.M. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.5, p.1063-1070, set./out. 2001.
- BARRUETO CID, L.P.; CRUZ, A.R.R. Embriogênese somática em *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 1999, Vitória. **Anais...** Vitória, ES: Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café, 2001. p.349-355. CD-ROM.
- BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos massproduced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.111-117, 1999.
- BOXTEL, J.van; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.169-176, 1996.
- CARVALHO, G.R.; PIO, R.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; SCARANTE, M.J. Efeitos do ácido giberélico e benzilaminopurina no desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, p.185-187, 1999.
- CASTRO, P.R. de C.; PITELLI A. M. de C. M.; PERES L.E. P.; ARAMAKI, P. H. Análise da atividade reguladora de crescimento vegetal de tiametoxam através de biotestes. **Ciências Exatas Terra, Ciências Agrônômicas e Engenharia**, v.13, n.3, p.25-29, dez. 2007.
- DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, v.19, p.507-509, 1984.
- DUCOS, J.P.; LABBE, G.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 6, 2007.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**; handbook and directory of commercial laboratories. Great Britain: British Library, 1984. 709p.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.533-568.
- HAKMAN, I.; ARNOLD, S.V. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). **Journal of Plant Physiology**, v.121, p.149-158, 1985.

- HEMERLY, A.S.; FERREIRA, P.; ENGLER, J.A.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; INZE, D. cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. **Plant Cell**, v.5, p.1711-1723, 1993.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. . In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. p.71-83.
- JELENSKA, J.; DECKERT, J.; KONDOROSI, E.; LEGOCKI, A.B. Mitotic B-type cyclins are differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. **Plant Science**, v.150, p.29-39, 2000.
- LANE, W.D.; Mc DOUGALD, J.M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.62, p.689-694, 1982.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, n.15, p.473-497, 1962.
- NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.10, n.608-612, 1992.
- NEWCOMB, W.; WETHERELL, D.F. The effects of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. **Botanical Gazette**, v.131, p.242-245, 1970.
- PEREIRA, A.R. **Embriogênese somática direta em *Coffea arabica* L. Acaia Cerrado**. 2005. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PEREIRA, A.R.; CARVALHO, S.; PEREIRA de; PASQUAL M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.
- PILET, P.E.; SAUGY, M. Effect on root of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, v.83, p.33-38, 1987.
- QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.
- RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P.S. Embryo culture. In: JOHRI, B.M. (Ed.). **Experimental embryology of vascular plants**. Berlin: Springer Verlag, 1982. p.195-230.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.51, n.3, p.264-274, Mar. 1964.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: procedures guide: version 6**. Cary, NC: 1990. 705p.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposium for the Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- STAMP, J.A., HENSHAW, G.G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, p. 183-187, 1982.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, v.19, p. 509-514, 1970.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P. DA C.; MELLO, R.I.S. de; SILVA, A.P.D. da; MUNDIM, D.A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Documentos).
- ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; TESSERAU, H.; BOLLON, H.; ESKES, A.; PÉTIARD, V. Développement d' un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogénèse somatique en milieu liquide. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1991. p.392-402.

