

MICROPROPAGAÇÃO DO CAFEIEIRO

LUIZ GONZAGA ESTEVES VIEIRA¹, ADILSON KENJI
KOBAYASHI²

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* L. possui cerca de 100 espécies (Cramer, 1957), sendo que somente duas espécies de café apresentam importância comercial e são plantadas de maneira extensiva, *Coffea arabica* L. (arábica) e *Coffea canephora* P. ex Fr. (robusta).

Coffea arabica é nativa do nordeste da África, em uma área que compreende o sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, sendo atualmente cultivado em regiões tropicais com altitudes acima de 500 metros, representando 70% mercado mundial de café. Esta espécie é a única tetraplóide ($2n = 44$) e autógama do gênero. A ausência de efeitos deletérios causados por autofecundações sucessivas e a baixa porcentagem de fecundação natural (Carvalho e Mônaco, 1962), fazem com que a forma predominante de propagação do café arábica seja feita por sementes.

Coffea canephora, como as outras espécies conhecidas do gênero *Coffea*, é diplóide ($2n=22$), apresentando auto-incompatibilidade do tipo gametofítica. Normalmente é plantado na África e na Ásia, em regiões de baixa altitude (geralmente abaixo de 850 m) e clima quente. No Brasil, o café robusta é produzido principalmente nos estados do Espírito Santo e Rondônia. Considerado como produtor de bebida caracterizada como neutra, é utilizado na manufatura de café solúvel e na elaboração de misturas. Como esta espécie é autoincompatível, cada semente resulta em uma planta híbrida. Se por um lado esta característica possibilita uma ampla base genética para a seleção de indivíduos superiores, constituiu-se em um problema para a

¹ Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Fone: (43) 3376-2429.
E-mail: lvieira@pr.gov.br

² Embrapa Mandioca e Fruticultura - Laboratório de Biotecnologia Vegetal. E-mail:
sac@cnpmf.embrapa.br

produção de genótipos superiores em larga escala.

No melhoramento do cafeeiro, ganhos genéticos para produtividade e outras características de interesse agrônomo são incorporadas através de cruzamentos. Entretanto, durante o processo de obtenção de cultivares de cafeeiro utilizando as metodologias de melhoramento convencional, um ciclo de seleção pode levar até quatro anos, considerando da obtenção de sementes até o florescimento das plantas e, novamente, a obtenção de sementes. Além disso, para obter dados consistentes, a avaliação de características relacionadas à produtividade é normalmente realizada em plantas com 6-8 anos de idade.

Assim, se considerarmos que, a partir do cruzamento inicial, vários ciclos de seleção são necessários para encontrar genótipos de cafeeiro com características desejáveis do ponto de vista agrônomo, um programa convencional de melhoramento pode demorar até 30 anos para obter novos cultivares. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas para propagação acelerada de plantas de cafeeiro é fundamental para aumentar a taxa de multiplicação e possibilitar a rápida difusão de novos cultivares.

MÉTODOS TRADICIONAIS DE PROPAGAÇÃO

Em café, como em quase todos os programas de melhoramento de espécies perenes, é essencial dispor de técnicas que permitam a obtenção rápida e em grande escala de genótipos superiores, na maioria das vezes representados por uma única planta.

A propagação por sementes é naturalmente o método prevalente, sendo utilizada para a multiplicação de plantas homozigotas ou para a obtenção de plantas híbridas provenientes de cruzamentos controlados, as quais podem compor variedades sintéticas.

Por outro lado, a propagação vegetativa do cafeeiro é recomendada quando é necessário: (1) perpetuar as características agrônomicas desejáveis de uma planta obtida através de cruzamentos intra ou interespecíficos; (2) obter variedades clonais para a formação de lavouras mais homogêneas e produtivas, principalmente em espécies alógamas, como *C. canephora*; e (3) multiplicar rapidamente plantas superiores ainda em estágio juvenil.

A técnica mais utilizada para a propagação vegetativa do cafeeiro é

a estaquia. Estacas de ramos ortotrópicos, contendo uma ou várias gemas, são tratadas com compostos auxínicos e enraizadas em diferentes substratos. Este método é conhecido há bastante tempo (Vilanova, 1959), sendo utilizado para a multiplicação de híbridos interespecíficos e, principalmente, de clones selecionados de *C. canephora*.

Apesar de ser bastante empregada para a multiplicação de café robusta, a estaquia é ainda considerada uma técnica ineficiente para obter rapidamente grande quantidade de material propagativo. Um dos problemas é a resposta diferencial de cada espécie e de clones aos tratamentos utilizados para o enraizamento das estacas (Paulino & Paulini, 1985; Bergo, 1997). Dependendo do estado fisiológico da planta doadora e do período do ano, a porcentagem de enraizamento das estacas pode variar de 60 a 80% (Cambrony, 1989). Além disso, o dimorfismo dos ramos vegetativos (plagiotrópicos e ortotrópicos) limita a quantidade de estacas que podem ser obtidas de uma planta, fazendo com que a pouca disponibilidade de material propagativo impeça o rápido lançamento de novos e melhores clones. Adicionalmente a estes problemas, a utilização desta forma de multiplicação exige a manutenção de jardins clonais com plantas em boas condições sanitárias e fisiológicas, o que nem sempre é possível em algumas condições ambientais.

Em *C. arabica*, as metodologias utilizadas para a obtenção de cultivares superiores são as mesmas normalmente empregadas para espécies autógamas, principalmente mediante seleção de plantas individuais seguido de hibridização e seleção de progênies. Portanto, a multiplicação de cultivares tem sido feita mediante sementes, pois é possível obter material homogêneo em grande quantidade e com baixo custo após algumas gerações de autofecundação. A propagação vegetativa do café arábica somente é justificada se houver a disponibilidade de híbridos promissores que apresentem características agrônomicas altamente desejáveis. Entretanto, como vários trabalhos têm mostrado a possibilidade de utilizar heterose em *C. arabica* (Srinivasan & Vishveshwara, 1978; Neto & Ferreira, 1980; Ameha, 1983; Bertrand et al., 1997; Fontes et al., 1999), tem havido uma crescente demanda para viabilizar métodos eficientes de propagação assexuada desta espécie para aproveitar os híbridos F_1 .

A enxertia é outro método usado para a propagação de genótipos de café. Apesar de bastante conhecida, esta técnica tem sido utilizada somente em situações especiais. Na África, há relatos do uso de porta-

enxertos para aumentar o crescimento de plantas mediante o aproveitamento do vigoroso sistema radicular de algumas espécies de café (Couturon & Berthaud, 1979). Tanto no Brasil como na América Central, a enxertia de *C. arabica* em *C. canephora* é usada como alternativa para o controle de nematóides em regiões com ocorrência desta praga (Costa et al., 1991).

MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

A introdução de métodos biotecnológicos para auxiliar os programas de melhoramento genético tem se mostrado bastante útil, principalmente em culturas perenes, como é o caso do cafeeiro. Técnicas de cultura de células e tecidos, como a embriogênese somática e a cultura de brotos apicais e axilares podem ser utilizadas para auxiliar a micropropagação acelerada de clones superiores para a avaliação, manutenção de híbridos interespecíficos, aproveitamento da heterose em híbridos intraespecíficos e para a rápida difusão de novos cultivares aos agricultores.

A micropropagação compreende uma gama de técnicas que permitem a manipulação de células e tecidos *in vitro* com o objetivo de desenvolver e propagar plantas de maneira rápida e eficiente. Para que possam ser utilizadas amplamente, é necessário que as técnicas de propagação *in vitro* produzam plantas que sejam geneticamente e fenotipicamente uniformes. Adicionalmente, outra grande vantagem da propagação é que plantas podem ser produzidas com menor risco de serem contaminadas por doenças.

Técnicas de cultura de células e tecidos vegetais foram inicialmente estudadas e estabelecidas para o cafeeiro a partir do trabalho pioneiro de Staritsky (1970), que descreveu a indução de embriões somáticos e plântulas oriundas de ramos ortotrópicos de *C. canephora*. A partir de então, vários trabalhos foram iniciados para a aplicação desses métodos no melhoramento do cafeeiro e, mais especificamente, para acelerar a multiplicação vegetativa desta cultura. As duas principais técnicas de multiplicação *in vitro* de plantas de café são a microestaquia e a embriogênese somática.

Microestacas

Em razão do dimorfismo vegetativo, uma planta de café possui ramos ortotrópicos e plagiotrópicos. A remoção do meristema apical de ramos ortotrópicos elimina a dominância apical e estimula o desenvolvimento de novos ramos ortotrópicos oriundos de gemas dormentes encontradas em axilas foliares. É possível produzir plantas com ramos ortotrópicos múltiplos por meio de podas freqüentes e continuadas. Também, novos brotos ortotrópicos podem ser desenvolvidos a partir de gemas presentes na superfície superior de ramos ortotrópicos curvados para atingir a posição horizontal.

Essas gemas axilares de ramos ortotrópicos podem ser utilizadas como fonte de material para a multiplicação de clones superiores. Os trabalhos iniciais para o desenvolvimento desta técnica em cafeeiro foram feitos por Custers et al. (1980) e Dublin (1980). Subseqüentemente, em função do potencial de aplicação prática desta técnica, diversos estudos foram realizados com vários graus de sucesso (Kantha et al., 1981; Nakamura & Sondhal, 1981; Zok, 1985; Ribeiro & Carneiro, 1989).

Semelhantemente aos protocolos de multiplicação de gemas axilares utilizados para a maioria de outras espécies perenes, a técnica de micropropagação em café em meio semi-sólido compreende três fases distintas. Primeiramente, explantes (gemas axilares) provenientes de ramos ortotrópicos de plantas cultivadas, preferencialmente em casa-de-vegetação, são inoculados em meio de cultura contendo reguladores de crescimento. Em função dos graves problemas de contaminação e oxidação fenólica dos explantes (Sondhal et al., 1985), esta é uma fase que requer extremo cuidado para evitar a morte dos explantes, acarretando um grande aumento dos custos envolvidos em toda a operação. Devem ser empregados protocolos de descontaminação superficial tão severos quanto possíveis para eliminar microrganismos, mas delicados o suficiente para evitar a morte dos explantes em consequência da oxidação de compostos fenólicos. Antibióticos e/ou fungicidas no meio inicial de cultura têm sido utilizados; entretanto, em função do grande aumento de custo, recomenda-se o emprego destes produtos somente em casos de multiplicação de materiais raros e de alto valor.

Após 2-3 meses, os brotos originários das gemas axilares estarão em condições para serem subdivididos e cultivados em novo meio de cultura, iniciando assim a segunda etapa do processo de propagação - multiplicação

clonal. O objetivo desta fase é obter o maior número possível de brotos por explante. Geralmente, microestacas são cultivadas em meio de cultura com citocininas (geralmente benzilaminopurina, entre 1 e 5 mgL⁻¹). Altos níveis de citocininas induzem o desenvolvimento de maior número de brotos, mas reduzem o tamanho dos entrenós e influenciam negativamente a capacidade de enraizamento das plantas (Berthouly & Etienne, 1999). Geralmente, a cada noventa dias, as plantas clonais são subdivididas, até um máximo de dois a três subcultivos, sendo possível obter uma média de até 7,5 brotos por cada gema axilar no final do terceiro subcultivo (Sondhal et al., 1984). Para determinados genótipos, com algumas de modificações nos protocolos básicos de multiplicação é possível obter até nove brotos/explante (Ribeiro & Carneiro, 1989). Mediante o cultivo de microestacas em meio líquido empregando o sistema de imersão temporária, Berthouly et al. (1994) mostrou que é possível aumentar em até seis vezes a taxa de multiplicação de brotos em comparação ao sistema tradicional de cultura de explantes em meio semi-sólido. Quando atingirem o estágio de quatro a cinco folhas, as plântulas estarão suficientemente desenvolvidas para iniciar a terceira fase do processo – aclimação e enraizamento, que pode ser realizada diretamente em estufas ou viveiros, com uma eficiência de até 98% (Etienne et al., 1997). Primeiramente, os ramos são tratados por 24 h com reguladores de crescimento (normalmente 100 mgL⁻¹ de ácido indolbutírico) para induzir a formação de raízes e, em seguida, transferidas para recipientes com substrato esterilizado. Após três meses em condições de temperatura e umidade controladas para permitir a aclimação, as plântulas podem ser transferidas para saquinhos plásticos, onde permanecem mais quatro meses. Assim, são necessários sete a oito meses após as fases de cultura para as plantas atingirem o desenvolvimento adequado para plantio em campo.

Além da sua simplicidade quando comparado com a propagação via embriogênese somática, a propagação de plantas de café por microestaquia reduz a chance do surgimento de plantas com características diferentes da planta-mãe (variação somaclonal), que é essencial em metodologias de multiplicação de genótipos superiores. Entretanto, o longo tempo entre o cultivo inicial das gemas axilares até a aclimação das plantas e o baixo rendimento faz com que o custo unitário da muda produzida por esta técnica seja proibitivo para cultivos comerciais. De acordo com Sondhal et al. (1999), o custo de mudas de *C. arabica* obtidas por microestaquia chega a ser sete vezes superior ao de mudas produzidas por métodos

tradicionais (sementes em saquinhos plásticos). Em suma, o número de plantas a serem obtidas no final do processo dependerá do número de gemas axilares inicialmente cultivadas, das perdas devidas à contaminação e oxidação fenólica, da taxa de multiplicação em cada subcultura e da eficiência do protocolo de aclimação e enraizamento.

Apesar do exemplo do uso desta técnica para a multiplicação de clones selecionados de Catimor na Costa Rica (CATIE - Promecafé), os fatores restritivos acima mencionados mostram que a propagação via microestaquia é recomendada somente para a produção em pequena escala de materiais para fins de pesquisa ou para a conservação de germoplasma.

Embriogênese somática

Embriogênese somática pode ser definida como o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas diplóides ou haplóides sem a fusão de gametas (Schultheis et al., 1990). O embrião somático é uma estrutura bipolar independente desenvolvida a partir da: (1) indução e ativação de células totipotentes; (2) formação de células ou grupo de células embriogênicas; (3) diferenciação bipolar; e (4) desenvolvimento do embrião segundo os estádios embrionários característicos, maturação e germinação de maneira similar àquela que ocorre com o embrião zigótico (Tisserat, 1985).

A embriogênese somática tem sido obtida em um grande número de famílias e espécies de plantas (Ammirato, 1983), e vem sendo usada para estudos básicos de fisiologia vegetal e, também, para aplicações mais práticas, como a micropropagação e transformação de plantas. O primeiro relato do processo de embriogênese somática em café foi feito por Staritsky (1970), que descreveu a indução de embriões somáticos usando explantes de ramos ortotrópicos de *C. canephora*. Logo a seguir, Sharp et al. (1973) obtiveram crescimento de calos de *C. arabica* a partir do cultivo de tecidos somáticos (pecíolos, folhas e frutos verdes). Em função das maiores dificuldades técnicas, embriões somáticos originários de explantes foliares de *C. arabica* somente foram obtidos por Hermann & Hass, em 1975.

Subseqüentemente, Sondhal & Sharp (1977) mostraram que a produção de embriões somáticos em explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon segue duas rotas distintas: (1) direta ou embriogênese de baixa frequência (LFSE – low frequency somatic embryogenesis), onde um

pequeno número de embriões surge de calos cicatriciais, na ausência de proliferação de calos indiferenciados; e (2) indireta ou embriogênese de alta frequência (HFSE – high frequency somatic embryogenesis), que permite grande produção de embriões somáticos mediante a cultura de explantes primeiramente em meio de proliferação de calos e, em seguida, em meio de indução de calos embriogênicos friáveis. Em ambos os casos, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do embrião zigótico, passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Nakamura et al., 1992).

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

Embriogênese direta

Embora a maioria dos trabalhos em micropropagação de café por meio da embriogênese somática utilize a estratégia de embriogênese indireta, combinando auxinas e citocininas em um sistema bifásico para induzir primeiramente a calogênese e, em seguida, a embriogênese, este sistema requer um longo período para obter plantas regeneradas. Em multiplicação clonal, a existência de uma longa fase para produção de calos indiferenciados no processo de embriogênese somática é considerada indesejável em virtude da maior probabilidade de ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas. Apesar de não haver estudos específicos determinando a relação entre variação somaclonal e o tipo de embriogênese somática, Michaux-Ferriere & Schwendiman (1992) apontam que, em comparação ao sistema indireto, o risco de ocorrência de variantes somaclonais no sistema de embriogênese direta (Figura 1) seria menor em função do tempo relativamente mais curto em cultura requerido para a formação de embriões.

Os primeiros trabalhos desenvolvidos na tentativa de eliminar ou diminuir a fase de calo na embriogênese somática de café foram relatados por Staristky & van Hasselt (1980). Estes autores mostraram que a resposta

aos reguladores de crescimento utilizados é extremamente dependente da espécie doadora e da origem dos explantes, mas estabeleceram, como regra geral, que altas concentrações de citocinina estimulam o desenvolvimento de embriões e que as auxinas favorecem a formação de calos. Dublin (1981) também levantou a possibilidade de que a propagação de café via embriogênese somática direta pode manter melhor a estabilidade do genótipo doador.

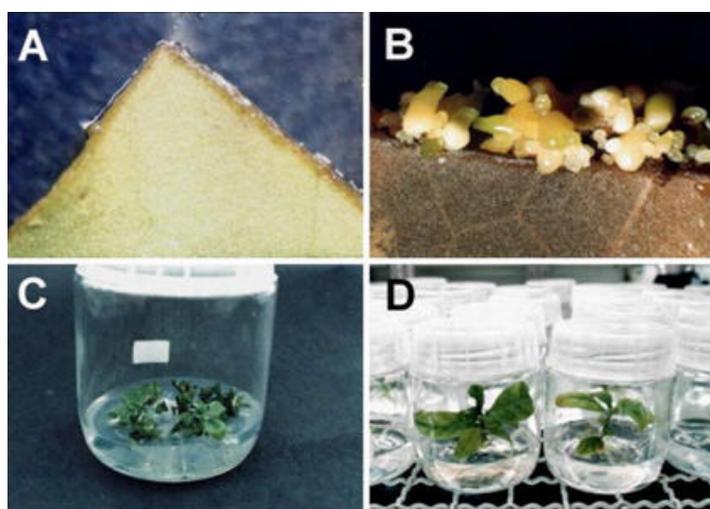


Figura 1- Embriogênese direta em *Coffea canephora*. (A) Explante de folhas jovens completamente expandidas após descontaminação superficial. (B) Embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, após 60 dias de cultivo em meio com citocinina. (C) Germinação de embriões somáticos. (D) Plântulas de café derivadas de embriões somáticos, prontas para serem aclimatadas em casa-de-vegetação.

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

que 2-isopenteniladenina, na concentração de 5 mM, foi a mais efetiva.

Nesta via de produção de embriões somáticos, utilizando somente citocinina como regulador de crescimento, uma pequena proliferação de calos foi observada nas bordas dos explantes foliares e, após 60-90 dias, já foi possível notar embriões somáticos originários desses calos embriogênicos. Como em explantes derivados de folhas maduras esta formação de calos não ocorreu, é possível que em tecidos de folhas jovens auxinas endógenas estejam presentes em quantidades suficientes para permitir a formação dessa pequena massa de calos e a regeneração de embriões somáticos (Nakamura et al., 1992).

Como pode ser verificado pelos trabalhos acima citados, *C. canephora* tem sido utilizada como espécie modelo na grande maioria dos trabalhos em embriogênese direta. Existe uma grande diferença entre *C. canephora* e *C. arabica* quanto à indução de embriogênese direta em explantes foliares. Enquanto que para a primeira espécie é relativamente fácil desencadear a formação de embriões somáticos em meio de cultura somente com citocininas (Dublin, 1981; Ramos et al., 1990; Hatanaka et al., 1991; Fuentes et al., 2000), há poucos relatos da obtenção de embriogênese direta em *C. arabica* (Yasuda et al., 1985; Calheiros, 1993). Esta diferença de resposta entre espécies e entre cultivares da mesma espécie, aliado a baixa frequência de formação de embriões, indica que este sistema não apresenta grande potencial para ser utilizado em processos de produção de propágulos de café em larga escala.

Embriogênese indireta

Apesar do maior tempo necessário entre a inoculação de explantes e a regeneração de embriões, o sistema de embriogênese indireta (Figura 2) é preferencialmente utilizado para estudos de multiplicação clonal de plântulas de café por adequar-se à produção em larga escala de embriões somáticos.

Este sistema segue uma seqüência de desenvolvimento característica (Sondhal & Sharp, 1977; Dublin, 1981). Ao contrário da embriogênese somática direta, a via indireta, requer a utilização de dois meios distintos de cultivo para a proliferação de calos e diferenciação de células embriogênicas. Durante a cultura primária dos explantes, ocorre o desenvolvimento de uma massa de calos amarelados e de rápido crescimento após 45 dias de cultivo

em meio contendo auxinas e citocininas. A transferência destes calos para um segundo meio de cultura com concentrações mais baixas de auxinas causa paralisação do crescimento e o escurecimento dos calos. Após 2-3 meses, calos secundários desenvolvem-se sobre os calos escuros não-proliferantes. Estes calos secundários são compostos de dois tipos de calos: (1) calos amarronzados com células alongadas recobertas com uma camada membranosa (não-embriogênicos) e (2) calos pró-embriogênicos, de coloração amarelo-creme, formados de células pequenas (15 a 20 µm de diâmetro), esféricas e com citoplasma denso (Nakamura et al., 1992).

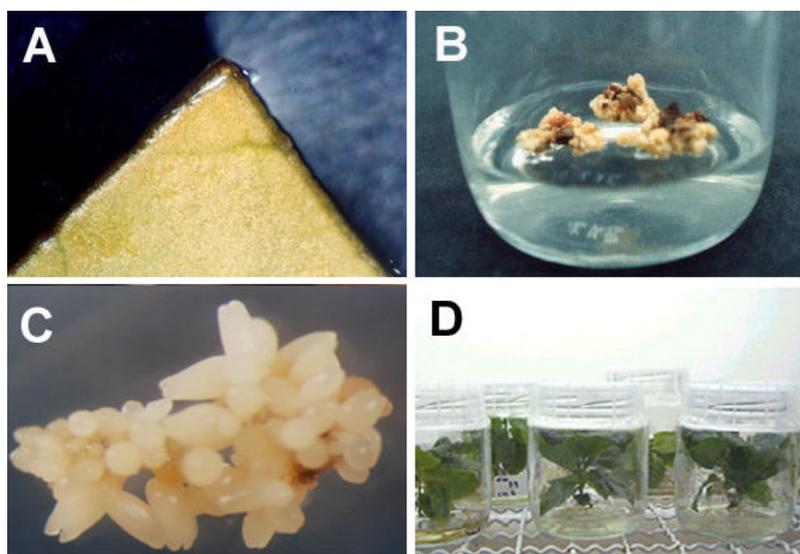


Figura 2- Embriogênese indireta em *Coffea arabica* cv. IAPAR 59. (A) Explante foliar em meio de cultura com alta relação auxina/citocinina. (B) Calos em meio de indução de células embriogênicas. (C) Embriões somáticos em desenvolvimento. (D) Plântulas regeneradas em meio semi-sólido sem reguladores de crescimento.

Em função do alto potencial deste sistema para a multiplicação em larga escala de plantas de café, inúmeros estudos foram realizados para a otimização dos protocolos de embriogênese indireta, tanto de *C. arabica*

quanto de *C. canephora*. Diferentes fatores influenciam o processo de embriogênese somática indireta. Apesar de ser considerada como uma espécie com excelente resposta aos tratamentos para induzir a embriogênese somática, a produção de embriões e a regeneração de plantas de café são fortemente dependentes de fatores genotípicos. Sondhal & Bragin (1991), encontraram grande variabilidade de resposta para a produção de embriões entre oito cultivares de *C. arabica*. Apesar de apresentarem uma melhor resposta geral para a indução de calos embriogênicos, diferenças entre genótipos de *C. canephora* também foram observadas (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Fuentes et al., 2000). Atualmente, em função dos recentes avanços no conhecimento sobre os fatores envolvidos na embriogênese somática indireta, é possível obter, ainda que em grau variável, embriões somáticos na maioria dos genótipos de café (Berthouly & Etienne, 1999). Entretanto, este fator ainda constitui um problema a ser vencido quando o objetivo é utilizar esta técnica para a multiplicação em escala comercial de plantas de café.

As condições fisiológicas da planta-mãe e do tecido doador são importantes para a obtenção de calos embriogênicos (Sondhal et al., 1985; Calheiros, 1993). Esta influência é claramente evidenciada pela variabilidade observada na frequência de indução de calos embriogênicos e na produção de embriões de explantes foliares obtidos em diferentes épocas do ano. É recomendável a colheita de material em condições ambientais de baixa umidade relativa para diminuir o nível de contaminação dos explantes. Também, maior frequência de embriogênese em clones de *C. canephora* foi obtida com explantes colhidos de plantas de café nos estádios de florescimento ou início de frutificação (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996).

O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são determinantes para a indução de diferentes respostas dos explantes. A presença de auxina no meio de cultura, sozinha ou em combinação com citocininas, é essencial para fase inicial de calogênese. Posteriormente, é fundamental reduzir a razão auxina/citocinina, ou até eliminar a auxina, para induzir a formação de calos embriogênicos e o desenvolvimento de embriões. A manutenção de níveis elevados de auxinas no meio de cultura impede o desenvolvimento de células embriogênicas em embriões globulares.

Multiplicação em larga escala

O grande potencial da embriogênese indireta para a multiplicação acelerada de plantas de café foi rapidamente notado desde os primeiros trabalhos. Os estudos para estabelecer os melhores protocolos para obter embriogênese somática em frequências mais altas foram realizados utilizando meio semi-sólido. Entretanto, a taxa de multiplicação obtida com o cultivo de explantes em meio semi-sólido mostrou-se muito baixa para o seu uso na produção de plantas de café em larga escala (Sondhal & Sharp, 1977).

A utilização de culturas líquidas é um pré-requisito para a automação e redução de custos em sistemas comerciais de propagação. Várias estratégias têm sido aplicadas para aumentar a taxa de multiplicação, tanto de sistemas baseados em organogênese como em embriogênese, pelo uso de biorreatores (Levin et al., 1988; Preil, 1991) ou pela imersão intermitente dos explantes em meio de cultura (Tisserat & Vandercook, 1985; Alvard et al., 1993).

Portanto, desde os primeiros trabalhos com café, houveram várias tentativas, com diferentes graus de sucesso para estabelecer protocolos de embriogênese somática em meio líquido (Staritsky & van Hasselt, 1980; de Peña, 1983; Baumann & Neuenschwander, 1990). Entretanto, o potencial existente para a produção em grande escala de embriões somáticos de cafeeiro em meio líquido foi descrito por Zamarripa et al. (1991). Com a renovação semanal do meio de cultura e utilizando baixa densidade de células embriogênicas, até 460.000 embriões/L de meio foram obtidos em frascos de Erlenmeyer (250 ml), após sete semanas de cultivo. A demonstração, também neste trabalho, que esta metodologia poderia ser usada em pequenos biorreatores de agitação mecânica, possibilitou novos progressos para a produção de embriões em meio líquido em escala industrial (Noriega & Sondhal, 1983; Ducos et al. 1993). O mesmo sistema de imersão temporária usado para a propagação de microestacas de café (Berthouly et al., 1994) foi adaptado com sucesso para a produção de embriões somáticos, proporcionando uma alternativa de baixo custo e sem algumas das limitações inerentes aos biorreatores tradicionais, eliminando as operações de isolamento e transferência de embriões para diferentes meios de cultura (Berthouly et al., 1995).

A capacidade de multiplicação de embriões somáticos em meio

líquido é muito alta, mesmo considerando as possíveis perdas na fase de germinação dos embriões e no endurecimento das plântulas. Apesar desta maior eficiência em comparação ao sistema de propagação em meio semi-sólido, o processo para obter plantas de café utilizando biorreatores (convencionais ou de imersão temporária) é ainda bastante moroso em função das características inerentes da cultura de tecidos em espécies perenes como o café. Considerando que, em média, são necessários seis meses desde a incubação inicial dos explantes até a obtenção dos calos embriogênicos, três meses para o estabelecimento de culturas das células embriogênicas em suspensão, três meses para a multiplicação e maturação dos embriões e seis meses para a germinação, conversão e crescimento das plântulas em viveiro, cerca de 18 a 20 meses são precisos para obter mudas prontas para plantio (Sondhal et al. 1999; Berthouly & Etienne, 1999).

A utilização de meios líquidos e biorreatores permitiram grandes progressos nas etapas de multiplicação e regeneração dos embriões somáticos. Entretanto, a maior limitação ainda está nas fases de endurecimento das plântulas e crescimento final em viveiros. Os custos envolvidos na manipulação dos embriões somáticos nestas fases são responsáveis por boa parte do preço final das mudas. O custo de mudas de café produzidas via embriogênese somática é três vezes superior ao daquelas obtidas via propagação convencional utilizando sementes em saquinhos plásticos (Sondhal et al., 1999). Na maioria dos trabalhos anteriormente mencionados, foi necessário o uso de meio semi-sólido para desenvolver embriões somáticos em plântulas com condições adequadas para a transferência para viveiros. Por demandar reagentes relativamente caros para solidificar o meio de cultura, mais tempo, mão-de-obra e espaço laboratorial para a germinação e conversão dos embriões em plântulas, esta fase pode inviabilizar a utilização comercial da técnica em virtude dos altos custos. Recentemente, Etienne-Barry et al. (1999) demonstraram a possibilidade de semear embriões germinados, produzidos em biorreatores de imersão temporária, diretamente em substrato estéril sob condições controladas de temperatura e umidade relativa em viveiros.

PRIORIDADES DE PESQUISA E APLICAÇÕES

Apesar dos inúmeros progressos alcançados nos últimos anos, alguns problemas ainda precisam ser resolvidos antes do uso prático da micropropagação clonal em café.

Muitos genótipos de espécies do gênero *Coffea* ainda são de difícil regeneração em cultura apesar dos grandes avanços obtidos nos protocolos de indução de células embriogênicas (Berthouly & Etienne, 1999). Portanto, para a utilização industrial, pesquisas ainda são necessárias para desenvolver protocolos de embriogênese somática que permitam aumentar a amplitude de genótipos capazes de produzir embriões somáticos em alta frequência.

Na maioria das espécies, o desenvolvimento de embriões somáticos de maneira sincronizada é somente atingido mediante a aplicação de métodos físicos e químicos específicos. Além de ser importante para estudos bioquímicos e genéticos, a sincronização da diferenciação de embriões é essencial para aumentar a eficiência do processo de micropropagação. Em café, alguns avanços na obtenção de embriões somáticos de maneira mais uniforme já foram relatados (Berthouly & Etienne, 1999; Fuentes et al., 2000), mas ainda é grande o desconhecimento dos fatores que controlam o desenvolvimento de embriões somáticos.

Sendo o valor econômico de uma única planta normalmente baixo, há necessidade de se dispor de material geneticamente superior e de valor agrônomo alto, como híbridos intra e interespecíficos, para justificar o maior custo das mudas obtidas via micropropagação (Sondhal et al., 1999). Além disso, todos os fatores envolvidos nas diversas etapas do processo de micropropagação devem ser analisados para verificar oportunidades de redução de custo.

Para a produção comercial de mudas, qualquer método de propagação clonal deve necessariamente permitir a obtenção de plantas idênticas ao material original. Em contraste com a técnica de microestaquia, que garante com uma relativa segurança a recuperação de plantas com características idênticas à planta-mãe, mais informações ainda são necessárias para evidenciar que a variação somaclonal em propagação via embriogênese somática não representa obstáculo para a aceitação desta tecnologia. Há indicações que a frequência de variação somaclonal observada em plantas oriundas de micropropagação via embriogênese somática não

difere daquela verificada em plantas derivadas de sementes (Sondhal et al., 1999). Entretanto, é importante estudar os parâmetros de variação específicos para cada protocolo de micropropagação, pois pequenas mudanças metodológicas podem causar efeitos dramáticos na qualidade do produto final.

Para espécies autógamas como *C. arabica*, considerando a tecnologia atualmente disponível, a micropropagação via embriogênese somática somente se justifica se usada na obtenção de materiais uniformes provenientes de programas de melhoramento que produzam híbridos interespecíficos, híbridos F₁ ou F₂ e retrocruzamentos de alto valor comercial. Para *C. canephora*, por ser uma espécie de fecundação cruzada, a embriogênese somática pode contribuir para a multiplicação acelerada de clones superiores e/ou daqueles que apresentam problemas de multiplicação pelos métodos convencionais. Finalmente, apesar da variabilidade genotípica para a resposta aos protocolos de embriogênese somática encontrada em diversos cultivares de café, principalmente de *C. arabica*, esta técnica tem sido fundamental para a obtenção de plantas de café transformadas tanto via *Agrobacterium* como também via bombardeamento de partículas. (Hatanaka et al., 1999; Leroy et al., 2000; Ribas et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A. et al. (Eds). **Handbook of Plant Cell Culture**, v. 1. Techniques for Propagation and Breeding. New York: Macmillan, 1983. p. 82-123.
- ALVARD, D., COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 32, p. 55-60. 1993.
- AMEHA, M. Heterosis in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease. I. First bearing stage. **Acta Horticultural**, v. 140, p. 155-161. 1983.
- BAUMANN, T.W.; NEUENSCHWANDER, B. Tissue culture in coffee biotechnology. **Café Cacao Thé**, v. 34, p. 158-164. 1990
- BERGO, C.L. **Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) através do enraizamento de estacas**. 62 p. Dissertação (Mestrado em

- Agronomia) – Univ. Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- BERTHOULY, M.; ALVARAD, D.; CARRASCO, C.; TEISSON, C. *In vitro* micropropagation of *Coffea* sp. by temporary immersion. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 8., 1994. Florence. **Anals...** Florence, 1994, p.162.
- BERTHOULY, M.; DUFOUR, M.; ALVARAD, D.; CARRASCO, C.; ALEMANN, L.; TEISSON, C. Coffee micropropagation in liquid medium using temporary immersion technique. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995. Kyoto. **Anals...** Paris: ASIC, 1995. p. 514-519.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Somatic embryogenesis of coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEÍRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/UFPR/IRD, 1999. p. 23-36.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.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.
- BERTHON, B.; AGUILAR, G.; SANTACREO, R.; ANTHONY, F.; ETIENNE, H.; ESKES, A.B.; CHARRIER, A. Comportement d'hybrides F1 de *Coffea arabica* pour la vigueur, la production et la fertilité en Amérique Centrale. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17, 1997, Nairobi. **Anals...** Paris: ASIC, 1997. p. 415-423.
- CALHEIROS, M.B.P. **Efeito da Aplicação de Poliaminas da Embriogênese Somática de Café (*Coffea* sp)**. 1993. 80 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal) – Univ. Estadual de Londrina, Londrina, 1993.
- CAMBRONY, H.R. 1989. Le cafeir. In: Le Technicien d'Agriculture Tropicale. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T., 166 p.
- CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. 1962. Natural cross-pollination in *Coffea arabica*. In: INTERNATIONAL HORTICULTURE CONGRESS, 16., 1962, Brussels. **Anals...** Brussels: ISHS, v. 4, p. 447-449.
- COSTA, W.M.; GONÇALVES, W.; FASUOLI, L.C. Produção de café Mundo Novo em porta-enxertos de *Coffea canephora* em áreas infestadas com *Meloidogyne incognita* raça 1. **Nematologia Brasileira**, v. 15, p. 43-50, 1991.

- COUTURON, E; BERTHAUD, J. Le greffage d'embryons de caféiers. **Café Cacao Thé**, v. 23, n. 4, p. 267-270, 1979.
- CRAMER, P.J.S. 1957. A review of literature of coffee research in Indonesia. In: WELLMAN, F. (Ed.) *Muc. Publ.*, 15, Turrialba, Inter. Amer. First Agric. Sci., 262 p.
- CUSTERS, J.B.M. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 9., 1980, London. **Anals...** Paris: ASIC, 1980. p. 589-596.
- DE PEÑA, M. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *C. arabica*. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGEM DE CAFEEIRO, 1983, Oeiras, **Anals...** Oeiras: CIFC, 1983. p. 493-512.
- DUBLIN, P. Multiplication végétative in vitro de l'Arabusta. **Café Cacao Thé**, v. 24, p. 281-290, 1980.
- DUBLIN, P. Embriogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café, Cacao, Thé**, v. 25, p. 237-242, 1981.
- DUCOS, J.P.; ZAMARRIPA, A.; ESKES, A.B.; PÉTIARD, V. Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Montpellier. **Anals...** Paris: ASIC, 1993. p. 89-96.
- ETIENNE, H.; SOLANO, W.; PEREIRA, A.; BERTRAND, B.; BERTHOULY, M. **Plantations, Recherche, Developpement**, v. 4, p. 306-310, 1997.
- ETIENNE-BARRY, D.; BERTRAND, B.; VASQUEZ, N.; ETIENNE, H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 111-117, 1999.
- FONTES, J.R.M.; CARDOSO, A.A.; CRUZ, C.D.; ZAMBOLIN, L.; SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A.A. Estudo da capacidade combinatória e da heterose em cruzamentos entre linhagens de Catuaí e Híbrido de Timor, em café. In SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/UFPR/IRD, 1999. p. 255-260.
- FUENTES, S.R.L., CALHEIROS, M.B.P., MANETTI-FILHO, J.; VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *C. canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 60, p. 5-13, 2000.
- HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N;

- YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 179-182, 1991.
- HATANAKA, T.; CHOI, Y.E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 106-110, 1999.
- HERMANN, F.R.P.; HASS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. **HortScience**, v. 10, p. 588-589, 1975.
- KARTHA, K.; MROGINSKY, L.; PAHL, K.; LEUNG, N. Germoplasm preservation of *Coffea arabica* L. by *in vitro* culture of shoot apical meristems. **Plant Science Letters**, v. 22, p. 301-307, 1981.
- LEROY, T.; HENRY, A.M.; ROYER, M.; ALTOSAAR, I.; FRUTOS, R.; DURIS, D.; PHILIPPE, R. Genetically modified plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 383-389, 2000.
- LEVIN, R.; GABA, V.; TAL, B.; HIRSH, S.; DENOLA, D.; VASIL, I.K. Automated plant tissue culture for mass propagation. **Bio/Technology**, v. 6, p. 1035-1040, 1988.
- MICHAUX-FERRIERE, N.; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTEE, Y. et al. (Eds). **Reproductive biology and plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 247-259.
- NAKAMURA, T.; SONDHAL, M.R. Multiplicação *in vitro* em *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 9., 1981, São Lourenço. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1981. p. 161-163.
- NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 61, n. 3, p. 476-486, 1992.
- NETO, K.A.; FERREIRA, J.B.D. Vigor de híbrido em cruzamentos de *Coffea arabica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 8., 1980, Campos do Jordão. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1980. p. 14-16.
- NORIEGA, C.; SONDHAL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Montpellier. **Anals...** Paris: ASIC, 1993. p. 73-81.

- PAULINO, A.J.; PAULINI, A.E. Observações preliminares sobre épocas de enraizamento na formação de mudas de conilon através de estacas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 12., 1985, Caxambu. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1985. p. 92-93.
- PREIL, W. Application of bioreactors in plant propagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed). **Micropropagation: Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 426-445.
- RAMOS, L.C.S.; YOKOO, E.Y.; GONÇALVES, W.; FAZUOLI, L.C. Embriogênese somática direta em café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16., 1990, Espírito Santo do Pinhal. **Anais...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1990. p. 64-65.
- RIBAS, A.F.; KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; GALVÃO, R.M.; VIEIRA, L.G.E. 2001. Transformation of *Coffea canephora* P. using particle bombardment. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: FUNAPE/REDBIO, 2001. p. 02-07.
- RIBEIRO, T.M.O.; CARNEIRO, M.F. Micropropagation by nodal culture of cultivars Caturra, Geisha and Catimor regenerated *in vitro*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 13., 1989, Colombia. **Anals...** Paris: ASIC, 1989. p. 757-765.
- SCHULTEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S (Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP-EMBRAPA, 1990. p. 227-249.
- SHARP, W.R.; CALDAS, L.S.; CROCOMO, O.J.; MÔNACO, L.C.; CARVALHO, A. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, v. 31, p. 67-74, 1973.
- SONDHAL, M.R.; BRAGIN, A. Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Anals...** Paris: ASIC, 1991. p. 701-710.
- SONDHAL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA- FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W. M. Coffee. In: AMMIRATO, P. V. et al. (Eds). **Handbook of Plant Cell Culture**, vol.3. New York: Macmillan, 1984. p 564-590.
- SONDHAL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of Coffee. In: HENKE, R.R. et al. (Eds). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 215-232.

- SONDHAL, M.R.; SONDHAL, C.N.; GONÇALVES, W. Custo comparativo de diferentes técnicas de clonagem. SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEÍRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/UFPR/IRD, 1999. p. 59-65.
- SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultures leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v. 81 p. 395-408, 1977.
- SRINIVASAN, C.; VISHVESHWARA, S. Heterosis and yield stability in arabica coffee. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 38, n. 3, p. 416-420, 1978.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica**, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.
- STARITSKY, G.; VAN HASSELT, G.A. The synchronised mass propagation of *Coffea canephora* *in vitro*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 9., 1980, Londres. **Anals...** Paris: ASIC, 1980. p. 597-602.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed). **Plant Cell Culture – A Practical Approach**. Oxford: IRL, 1985. p. 79-105.
- TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C.E. Development of an automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 5, p. 107-117, 1985.
- VILANOVA, T. Propagación vegetative del cafeto. **El Café de El Salvador**, v. 29, p. 669-681, 1959.
- YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiology**, v. 26, p. 595-597, 1985.
- ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; TESSERAU, H.; BOLLON, H.; ESKES, A.B.; PÉTIARD, V. Développement d'un procede de multiplication em masse du caféier par embryogenèse somatique em milieu liquide. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. **Anals...** Paris: ASIC, 1991. p. 392-402.
- ZOK, S. La multiplication végétative *in vitro* des cafeiers cultivés pur culture de meristemes et d'apex. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 11., 1985, Togo. **Anals...** Paris: ASIC, 1985. p. 461-477.