

RINALDO ANDRADE REZENDE

**EFEITOS DE FITORREGULADORES, ANTIOXIDANTE E
DEFENSIVOS NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA
"in vivo" e "in vitro" de *Coffea arabica* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "MESTRE".

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

A

Deus, por tudo.

Aos meus pais

Carlos Alberto de Rezende Neto e
Sônia Andrade de Rezende

OFEREÇO

A minha esposa Rozimara Botelho Andrade
Rezende, por todo carinho e compreensão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade da realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Moacir Pasqual pela orientação, amizade e dedicação.

Aos Professores **José Darlan Ramos e Nilton Nagib Jorge Chalfun** pela coorientação, amizade e convívio.

Aos colegas Gladyston Carvalho e **Luís Eduardo** pela amizade, convívio e colaboração na confecção da dissertação.

Aos laboratoristas Evaldo e Vantuil pelo apoio e convívio.

As secretárias Nelzi, Sílvia e Viviane pela amizade e convívio.

BIOGRAFIA DO AUTOR

RINALDO ANDRADE REZENDE, nascido em Lavras-MG, a 01 de julho de 1962, filho de Carlos Alberto de Rezende Neto e Sônia Andrade de Rezende.

Concluiu seus estudos de Graduação em Agronomia na Universidade de Alfenas - UNIFENAS em janeiro de 1993.

Iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia/Cafeicultura, na UFLA, em março de 1993.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Quadros	vii
Lista de Figuras.....	viii
Resumo	x
Summary	xii
1 Introdução	1
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 Propagação vegetativa 'in vivo'	3
2.2 Propagação vegetativa 'in vitro'	8
2.2.1 Meios de Cultivo na multiplicação 'in vitro'	10
2.2.2 Fungicidas no meio de cultura.....	14
2.3 Aclimatização.....	16
3. Material e Métodos	20
3.1 Experimento 1: Propagação vegetativa 'in vivo'	20
3.2 Experimento 2 e 3: Propagação vegetativa 'in vitro'	22
3.3 Experimento 4: Aclimatização de brotos produzidos 'in vitro'	23
4. Resultados e Discussão.....	25
4.1 Experimento 1: Propagação vegetativa 'in vivo'	25
4.1.1 Enraizamento de Estacas.....	26
4.1.2 Peso da matéria fresca do sistema radicular	29
4.1.3 Peso da matéria seca do sistema radicular.....	30
4.2 Experimento 2: Concentrações de BAP x Concentrações de Benomyl.....	32
4.3 Experimento 3: Concentrações de BAP x Concentrações de Triadimenol.....	35
4.4 Experimento 4: Aclimatização de brotos produzidos 'in vitro'	38
5 Conclusões.....	42
Referências Bibliográficas.....	43

LISTA DE QUADROS

QUADROS	Página
1 - Análise de variância para número de folhas/estaca, comprimento de brotos, enraizamento de estacas, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. UFLA, Lavras - MG, 1995.....	26
2 - Análise de variância dos dados de comprimento médio; número total e número de brotos maiores que 1 un em explantes de <i>Coffea arabica</i> L. cultivados "in vitro". UFLA, Lavras - MG, 1995.....	32
3 - Análise de variância para as características número total de brotos, número de brotos iguais ou maiores a 1cm e peso da matéria seca da parte aérea de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuai, UFLA, Lavras - MG, 1995.....	35
4 - Análise de variância para as características altura de plantas (AP), comprimento de raízes (CR), peso da matéria fresca do sistema radicular (PMFSR), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA) de <i>Coffea arabica</i> L. UFLA, Lavras - MG, 1995.	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
<p>1 -Análise de regressão entre enraizamento de estacas e concentrações de PVP₄₀(mg/L). UFLA, Lavras-MG, 1995.....</p>	27
<p>2 - Análise de regressão entre enraizamento de estacas e tempo de imersão (h). UFLA, Lavras-MG, 1995.....</p>	29
<p>3 -Análise de regressão entre peso da matéria fresca do sistema radicular e concentrações de PVP₄₀ (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 1995.....</p>	30
<p>4 -Análise de regressão entre peso da matéria seca do sistema radicular e concentrações de PVP₄₀ (mg/L). UFLA, Lavras-MG, 1995.</p>	31
<p>5 - Número de brotações iguais ou maiores a 1 <i>cm</i> em explantes de <i>Coffea arabica</i> L, como função de doses de BAP adicionadas ao meio de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1995</p>	33
<p>6 - Número total de brotações em explantes de <i>Coffea arabica</i> L., como função de doses de BAP adicionadas ao meio de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.....</p>	34
<p>7 - Efeito da interação Triadimenol e BAP para a característica número total de brotos. UFLA, Lavras - MG, 1995.....</p>	37
<p>8 - Efeito da interação Triadimenol e BAP na característica matéria seca da parte aérea. UFLA, Lavras - MG, 1995.....</p>	37
<p>9 - Efeitos das concentrações de Triadimenol sobre o número de brotos iguais ou maiores a 1 <i>cm</i>. UFLA, Lavras - MG, 1995.....</p>	38

10 - Efeito dos tempos de imersão na altura de plantas de *Coffea arabica* aclimatizadas em relação as concentrações de AIB. UFLA, Lavras - MG, 1995.....

40

....

11 - Efeito das concentrações de A16 no comprimento de raíz das mudas de *Coffea arabica* L. aclimatizadas em relação a imersão por 24 h. UFLA, Lavras-MG, 1995.....

41

RESUMO

REZENDE, Rinaldo Andrade. **EFEITOS DE FITORREGULADORES, ANTIOXIDANTE E DEFENSIVOS NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA "in vivo" e "in vitro" de *Coffea arabica* L**. Lavras: UFLA, 1995. 51p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).*

O presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos de ácido indolbutírico (AIB) e do antioxidante polivinilpirrolidone (PVP40) sobre a propagação vegetativa "in vivo"; benzilaminopurina (BAP), Benomyl e Triadimenol na propagação vegetativa "in vitro" e ácido indolbutírico (AIB) sobre o enraizamento de brotações produzidas "in vitro", durante a fase de aclimatização, em cafeeiro (*Coffea arabica* L). Os experimentos foram realizados em casade-vegetação e no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras - UFLA. No experimento 1 utilizou-se o delineamento "inteiramente casualizado" em esquema fatorial $4 \times 4 + 1$, com 4 repetições e 10 estacas/parcela. Os tratamentos constituíram-se de PVP40 (0, 500, 1000 e 2000 mg/l), tempo de imersão (6, 12, 24 e 48 horas). A seguir foram imersos em AIB (100 mg/l), tempo de imersão (12 horas); Benlate (Benomyl), imersão rápida (0,1%, 2 minutos); testemunha seca. Nos experimentos 2 e 3 (Propagação vegetativa "in vitro") utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e delineamento em blocos casualizados respectivamente, em esquema fatorial, com os seguintes tratamentos; experimento 2: concentrações de BAP (0, 3, 6 e 9mg/L) e Concentrações de Benomyl (0, 100, 200, 300 e 400mg/L) num fatorial 4×5 , com 5 repetições 3 explantes/frasco; experimento 3: concentrações de BAP (0, 3, 6 e 9mg/L) x concentrações de Triadimenol (0, 100, 200 e 400mg/L), num fatorial 4×4 , com 4 repetições e 1 explante/tubo. No experimento 4 os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de AIB (0, 10, 20 e 40mg/L), nas quais as bases das brotações foram imersas por diferentes períodos de tempo (0, 12 e 24 horas). O

Orientador; Prof. Moacir Pasqual, Membros da Banca: Prof. Milton Moreira de Carvalho, Prof. Amauri Alves Alvarenga.

4 repetições e 3 plantas por parcela. As avaliações foram feitas 120 dias após a instalação dos experimentos, avaliando-se para cada experimento algumas das seguintes características: enraizamento de estacas, número de folhas, comprimento de brotos, comprimento de raízes, número total de brotações, número de brotações iguais ou maiores a 1cm, peso da matéria fresca e seca da parte aérea, peso da matéria fresca e seca do sistema radicular. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que: o antioxidante PVP40 foi melhor na dosagem 330 mg/l durante 6 horas para a cultivar Mundo Novo (LCP - 379/19), apresentando um percentual de enraizamento de 68%; o BAP foi melhor a 9 mg/L na ausência de Benomyl e Triadimenol tendo este demonstrado efeito negativo para a cv. Catuaí 2077-2-5-44; a melhor concentração foi 40 mg/L de AIB por 24 horas para o crescimento das plantas, não alterando a matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular para a cv. Catuaí 2077-2-5-44.

SUMMARY

Effects of the Fitoregulators, antioxidant and defensives in vivo and in vitro vegetative propagation of the *Coffea arabica* L.

The objectives of this work was to evaluate the effects of the following on Coffee plants (*Coffea arabica* L.) during the acclimation phase: indolbutiric acid (IBA) and PVP on the "in vivo" vegetative propagation; benzilaminopurine, benomyl and Triadimenol on the "in vitro" vegetative propagation; and indolbutiric acid on the roating of sprouts produced "in vitro". The experiments were carried out in a greenhouse and in the tissue culture laboratory of the Agriculture Department (DAG) at the Federal University of Lavras - UFLA. In experiment 1, the estatistical design was enterely randomized in 4x4+1 factorial scheme, with 4 repetitions and 10 slips/ parcel. The treatments coustisted of: PVP40 (0, 500, 1000 and 2000mg/L); immersion tissue (6, 12, 24 and 48hours). The slips were immersid in: IBA (100mg/L) for 12 hours; in benlate 0,1%(benomil) for 2 minutes (quick immersion); dry control. In experiments 2 and 3 ("in vitro" vegetative propagation) the statistical designs used were enterely randomized and in blocks, respectively; in factorial scheme. The treatments were: Experiment 2: BAP concentrations (0, 3, 6 and 9mg/L), benomyl concentrations (0, 100, 200, 300 and 400mg/L) in 4x5 factorial scheme, with 5 repetitions and 3 explantes/ tube. Experiment 3: BAP concentrations (0, 3, 6 and 9mg/L), Triadimenol concentrations (0, 100, 200 and 400mg/L) in 4x4 factorial scheme, with 4 repetitions and 1 explant/tube. In experiment 4, the treatments consisted of different IBA concentrations (0, 10, 20 and 40mg/L) in which the sprouts bases was immersed for different periods of time (0, 12 and 24 hours). The Statistical design was enterely randomized in 4x3 factorial scheme, with 4 repetitions and 3 plants per parcel. The evaluations were done 120 days after installing the experiments. For each experiment, some of the following characteristics were evaluated: rooting percentage, number of leaves, lenght of the sprouts, total number of sprouts, number of sprouts larger or egual to 1cm, weight of the aereal part fresh and dry matter, weigth of the root fresh and dry matter. Based on the results, it could be concluded: antioxidant

(PVP40) was the best in the dosage 330 mg/L for 0 hours to a cultivar Mundo Novo (379/19), presenting a 68% rooting percentage; the benomyl and Triadimenol fungicides were not efficient in promoting the "in vitro" sprouts proliferation; the presence of BAP in the culture medium helps the multiplication of sprouts, the best concentration being 9mg/L; the use of 40mg/L of IBA in 24 hours of immersion promotes more growth in the aerial part (5 cm high); the IBA does not help to increase the weight of the fresh matter of the root and the aerial part.

■INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de café, representando uma das maiores fontes de divisas para o país.

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 L.* No Brasil, a predominância das plantações de *Coffea arabica L.* também é marcante, com destaque para os estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo o Sul de Minas, Cerrado Mineiro (Vale Paranaíba) e a Mogiana Paulista as regiões que, tradicionalmente, produzem o café de melhor qualidade no país. O *Coffea canephora* é usualmente plantado em regiões tropicais de baixa altitude. O estado do Espírito Santo é o representante produtor dos cafés para o gênero não arábica.

O café é um dos produtos agrícolas mais importantes do mundo; exercendo grande influência sobre a economia dos países produtores. Vários fatores limitantes da produção têm levado os pesquisadores a desenvolverem novas cultivares ou linhagens, com características de produção associadas a resistência à pragas e doenças, ou ainda tolerância às condições de solo e clima desfavoráveis.

A partir da hibridação e seleção de germoplasma de *Coffea arabica L.*, necessita-se aproximadamente 30 anos para produzir uma nova cultivar.

A multiplicação vegetativa deveria ocupar um papel de destaque no melhoramento genético do cafeeiro no transcurso dos próximos anos. Todavia, como consequência do dimorfismo vegetativo próprio da planta, a multiplicação assexuada por métodos tradicionais só pode ser realizada a partir de fragmentos de ramos ortotrópicos.

Os métodos "in vitro" oferecem o potencial de se obter altas taxas de multiplicação a partir de explantes muito pequenos e de conseguir grande número de indivíduos isentos de microorganismos em espaços bastante reduzidos. **As** sementes de *café* perdem a viabilidade num espaço de aproximadamente 6 meses e o intercâmbio de **germoplasma** está limitado pelo perigo da disseminação de pragas e doenças tais como ferrugem, broca e nematóides. **Os** métodos de cultura de tecidos oferecem alternativas viáveis para amenizar estes problemas. **A** conservação de **germoplasma** "in vitro" reduz **custos e** elimina riscos de perdas por diversos imprevistos (Londoño, Pizzini e Rodriguez, 1981).

Toda técnica que permita aumentar desde o **começo** a taxa de multiplicação, manter as características genéticas e acelerar a instalação de determinada cultura em viveiros, apresenta interesse real para o melhoramento genético destas plantas (Dublin, 1984).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar **os** efeitos de fitorreguladores, antioxidante e defensivos na propagação vegetativa "in vivo" e "in vitro" de *coffea arabica* L.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Propagação Vegetativa 'in vivo'

O café é um arbusto contínuo, que apresenta um característico dimorfismo dos ramos: ramos ortotrópicos, que crescem verticalmente e ramos plagiotrópicos, que crescem lateralmente numa inclinação de 45° a 90° em relação ao eixo principal. Esses ramos originam-se de gemas diferencialmente determinadas, a partir da haste principal ortotrópica (Carvalho, Krug e Mendes, 1950).

Na axila de cada folha, nos eixos verticais, existe uma série linear ordenada de 5 a 6 gemas (gemas seriadas) e isolada acima dessa série, uma outra gema denominada "cabeça-de-série", que se forma na planta a partir do 8º ao 10º nó. Num fenômeno de determinismo morfológico, as gemas cabeça-de-série dão origem unicamente aos ramos laterais ou plagiotrópicos (ramos produtivos) e as seriadas aos ramos ladrões ou ortotrópicos. Em condições de altas temperaturas, segundo Went (1957), as gemas seriadas brotam espontaneamente, ficando a planta com aspecto entouceirado.

A planta de café se forma normalmente de um só ramo central. Em seu ápice há uma zona de crescimento ativo que durante toda a vida da planta vai aumentando o diâmetro do ramo central, formando-se nós e entre-nós (Leon, 1968).

André (1983) menciona que o cafeeiro se caracteriza por apresentar uma grande especialização em seus ramos. Os ramos ortotrópicos são responsáveis pelo crescimento em altura enquanto os ramos laterais se formam de crescimento plagiotrópico com característica aparentemente irreversível. Este dimorfismo caulinar se

caracteriza por uma diferenciação somática de natureza permanente e susceptível de ser propagada vegetativamente.

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).

A propagação vegetativa através do uso de estacas é uma técnica agrônômica antiga, sendo muito empregada devido a facilidade e rapidez na execução. No entanto, a capacidade de enraizamento de algumas espécies é inferior devido a componentes bioquímicos da própria planta, como também às condições ambientais em que estão submetidas.

As diferenças genéticas da capacidade de enraizamento, segundo Haissig (1986), podem estar relacionadas com a atividade de enzimas específicas. O número de genes e vias metabólicas não são conhecidos, apenas sabe-se que não necessariamente os mesmos genes são responsáveis pelo processo de rizogênese (Haissig e Riemenschneider, 1988). Miller, Hinesley e Blazich. (1982), avaliando fatores no enraizamento de *Abies fraseri* (Pursh) Poir, verificaram pronunciada variação genotípica em relação ao número de estacas enraizadas, número e comprimento de raízes. A diferença genética do enraizamento de cultivares de abacateiro foi relatada por Reuveni e Raviv (1981), que as classificou em grupos de fácil e difícil enraizamento. Carter (1984), estudando o enraizamento de diferentes clones de *Larix laricina* (DU ROI) K. Koch., observou grande diferença na porcentagem de enraizamento, variando de 23 até 93%.

Gaspar e Hofinger (1988) citam a especificidade das auxinas na promoção do enraizamento. Conforme esses autores, ocorre uma variação endógena de auxinas livres e conjugadas durante a rizogênese incluindo anabolismo, catabolismo e conjugação.

O tratamento de espécies de difícil enraizamento através da aplicação de auxina apresenta vantagens como o aumento da porcentagem de enraizamento, antecipação da indução e aumento do número, qualidade e uniformidade das raízes.

O ácido indolil acético (AIA) é a auxina natural mais encontrada nas plantas, tanto na forma livre como conjugada. A partir de sua descoberta, testes com os análogos, tais como ácido indol butírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA) comprovaram o grande efeito na promoção do enraizamento, sendo denominados de auxinas sintéticas. Mais tarde outros compostos como o ácido **2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)** e ácido **2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)** foram também incluídos neste grupo. Hostalácio, Soares e Coelho. (1977) testaram a eficácia do ANA e AIB no enraizamento de Mino de Vênus (*Hibiscus rosa sinensis*) e Três Marias (*Bonngainvillea spectabilis*). A primeira espécie citada enraizou após imersão em solução contendo **0,98 μM** de AIB enquanto a segunda foi induzida após tratamento com **0,54 μM** de ANA.

O AIB é citado com freqüência em trabalhos de propagação vegetativa por estaquia, devido principalmente à sua estabilidade, maior espectro de ação em diferentes espécies e menor fitotoxidez em plantas lenhosas (Proebsting, 1984). Abedini e Morlats (1988) enraizaram estacas de diferentes genótipos de *Eucaliptus camaldulensis* Dehn. após tratamento com **9,8 μM** de AIB. Martins (1985) trabalhando com *Coffea arabica* cv. bourbon amarelo utilizando AIB no enraizamento de estacas verificou a influência benéfica deste regulador quanto ao número de raízes emitidas.

As bases fisiológicas dessas diferenças, como no caso da reduzida indução pelo AIA comparado ao ANA e AIB são atribuídas, segundo Leopold e Kriedemann (1975), aos diversos mecanismos metabólicos que a planta possui para reduzir ou anular os efeitos do AIA, através da conjugação e/ou destruição. Além disso, o AIA apresenta problemas na sua estabilidade com o efeito da luz.

A fitotoxidez das auxinas foi observada por São José, et al (1992) em estacas de urucum após imersão em solução contendo **1,97 μM** de AIB, durante um período de **12** horas. Esse é apenas um exemplo em que se observa uma relação inadequada entre a

concentração da **solução** e o tempo de imersão. Igboanugo (1987) procurou determinar uma relação adequada desses fatores na propagação por estaquia em 3 espécies de *Eucalyptus* (*E. cloeziana*, *E. tereticomis* e *E. grandis*). Os períodos de imersão testados foram 3, 6, 12 e 24 horas em solução contendo 0,12; 0,25; 0,37 e 0,49 μM de AIB. O autor verificou que em todas as espécies, a concentração de 0,12 μM proporcionou bom enraizamento, sendo que após 6 ou 12 horas houve um decréscimo, não ocorrendo em tratamentos com 24 horas de imersão.

Os substratos com meio de enraizamento também influenciam a propagação por estacas, determinando a arquitetura do sistema radicular e o estado nutricional das plantas (Spurr e Barnes, 1973). São características desejáveis, a firmeza, o volume razoavelmente constante quando **seco** ou úmido, a capacidade de retenção de umidade, a porosidade para facilitar a drenagem e aeração, o baixo nível de salinidade e a disponibilidade de nutrientes (Hartmann e Kester, 1975).

O substrato comercial denominado Plantimax, composto de vermiculita e casca de Pinus moída, compostada e enriquecida, proporcionou melhores características de fertilidade e teores de nutrientes no peso da matéria **seca** total em limoeiro 'Cravo' (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Cravo) conforme Lira (1990). Quando o mesmo composto foi utilizado na formação de mudas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio, em diferentes formulações com **solo**, areia, bagaço de cana, vermiculita e húmus de minhoca, não foram verificadas diferenças significativas (Toledo, 1992).

Um dos maiores problemas em espécies lenhosas está relacionado com a oxidação fenólica. Segundo George e Sherrington (1984), a oxidação de compostos fenólicos ocorre em tecidos lesionados devido à ação de enzimas oxidases. As extremidades dos tecidos escurecem rapidamente e são liberados produtos tóxicos da oxidação. Esse problema é particularmente agravado no isolamento de explantes de espécies lenhosas, devido à maior síntese de lignina nos tecidos (Grattapaglia e Machado, 1990).

Várias medidas são citadas por George e Sherrington (1984) na prevenção da oxidação fenólica.

A remoção de compostos fenólicos produzidos pode ocorrer através de água corrente como pré-tratamento de explantes e a utilização de carvão ativado ou antioxidante.

O período de manutenção dos explantes em água é variável conforme a espécie. O antioxidante polivinilpirrolidone (PVP) tem sido bastante empregado. Carvalho, Pinto e Pasqual (1990) controlaram a oxidação em explantes de *Eucalyptus grandis* em até 90% suplementando com PVP 250 mM em meio sólido. Walkey (1972) incorporou o PVP ao meio de isolamento de meristemas de macieira e verificou sua essencialidade para um bom desenvolvimento do explante.

Conforme Debergh e Read (1991), alguns micronutrientes como Mn e Cu podem estimular a oxidação de fenóis e, portanto, meios com baixa concentração desses nutrientes são recomendados.

Snoeck (1968) afirma que, de maneira geral, estacas de *Coffea canephora P.* enraizam bem sem reguladores de crescimento, embora alguns cultivares necessitem de tratamentos com reguladores para que tenham sua taxa de enraizamento aumentada. Contudo, Domingo e Catabay (1961) citam que o tratamento com reguladores de crescimento em estacas de *Coffea canephora P.* (robusta) não afeta a porcentagem de enraizamento, mas aumenta o número de raízes por estaca.

Em *Coffea arabica L.*, Purushotham e Vishveshwara (1980), Arcilla-Pulgarin e Valencia-Aristizabal (1976), trabalhando com cultivares não mencionados, e Van De Vossen e Op. De Laak (1976), com os cultivares SL 28 e SL 32, citam que para o enraizamento de estacas desses cultivares não há necessidade de tratamento químico. Entretanto, Fiester (1953) afirma que, para estacas do cultivar Típica, não só o tipo de regulador usado mas também a concentração influem muito no enraizamento.

Arcila-Pulgarin e Valencia-Aristizabal (1976), trabalhando com cultivar não mencionado de *Coffea arabica L.*, utilizando caixa de concreto com 1,0 x 0,70 x 0,30 m preenchidas com areia, cisco de café, borra de café ou serragem de madeira, chegaram a obter entre 60-70% de enraizamento em 2 meses e 80-90% em 3 meses.

2.2 Propagação Vegetativa "in vitro"

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.

Apesar do tempo e dos recursos despendidos, os programas de melhoramento do cafeeiro no Brasil têm alcançado sucesso na obtenção de cultivares produtivas, elevando em cerca de 200% a produtividade das atuais cultivares em relação à primeira variedade plantada no Brasil (Carvalho, Krug e Mendes, 1950). Contudo, nos últimos anos surgiram novos problemas como doenças, pragas, nematóides, maior exigência do mercado consumidor quanto a qualidade do produto obtido, etc. A propagação vegetativa "in vitro" surge como alternativa, a curto prazo, para a solução desses problemas.

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 diversas.

O material genético de *C. arabica* representa um pool muito estreito de genes. A produção comercial na mesma população resulta num pequeno avanço genético. A indução de mutações poderá oferecer uma gama de variedades para o produtor. No caso de plantas com elevado nível de alogamia (*C. canephora*), onde as progênies são altamente heterogêneas, pelos métodos de cultura de tecidos é possível propagar matrizes excepcionais (Sondahl, Monaco e Sharp, 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).

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 al. 1975).

Os teores relativos, flutuantes entre auxinas e citocininas, determinam o desenvolvimento preponderante em brotos, raízes ou calos, submetidos posteriormente, à manipulação (Cambrony e Snoeck, 1983).

Custer, Van e Buijs, (1980), na tentativa de propagar o cafeeiro *C. arabica* "in vitro", através de segmentos nodais, registraram uma baixa taxa de multiplicação - 2.2 novos brotos/explante - usando meio de Murashige e Skoog (MS), acrescido de Benzilaminopurina (BAP) 9.9mg/l e AIA 0.1mg/l. Os mesmos autores, trabalhando com diversas citocininas, entre elas o BAP, visando o desenvolvimento de gemas axilares, obtiveram o seu melhor resultado após 7 semanas de cultivo em BAP 10mg/l com média de 2.8 gemas/nó. As outras citocininas não foram tão satisfatórias como o BAP.

As culturas de órgãos e tecidos dos cafeeiros 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.

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, Kelly e Smith, 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).

A propagação vegetativa por cultura de brotos axilares tem sido demonstrada no 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 Filho et al., 1983). Pode-se obter rapidamente brotos vigorosos utilizando explantes com dois nós, que podem ser colocados horizontalmente ou verticalmente no meio da cultura (Dublin, 1980, 1984). O mesmo autor em 1991, recomenda o **uso** de explantes com um par de folhas reduzidas à metade e um fragmento de entre-nó. **Os** melhores explantes são fragmentos de talos ortotrópicos com gemas pré-existentes. **A** propagação "in vitro" a partir de brotos ortotrópicos existentes é praticamente **irrealizável** em razão das enormes dificuldades de desinfecção desses brotos (Dublin, 1980).

2.2.1 Meios de Cultivo na Multiplicação "In vitro"

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 al., 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 (Cambony & Snoeck, 1983).

Desde 1962, a maioria dos pesquisadores usa o meio de Murashige e Skoog - "MS" - ou seus derivados, "SH" e "B5". **A** maior diferença dentre estes meios está na quantidade e forma de N e nas quantidades relativas de alguns **macroelementos** (Thorpe e Patel, 1984).

Na cultura de tecidos, as citocininas têm sido apontadas como causadoras do início de brotação em muitas plantas. **HA** também evidências que as citocininas possuem

importância fisiológica. Não só causam brotação como também liberam brotos que estão inibidos (Sachs e Thimann, 1967). A maioria dos explantes "in vitro" não sintetiza citocininas o suficiente para permitir um crescimento contínuo, assim a citocinina no meio de cultura é indispensável para a indução e desenvolvimento de gemas neoformadas. A citocinina 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, 1980). 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; Guevara, 1987).

O IPA (isopentenil adenina) também é eficaz na ação indutora de brotos. Concentrações superiores a 1mg/l traduz-se por um aumento notável do número de brotos por explante (Dublin, 1980). Zok e 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.

Os trabalhos pioneiros com microestacas visando a micropropagação do cafeeiro foram feitos 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 desenvolvidas "in vitro" apresentavam um porte vertical, comparável aos daqueles obtidos de gemas ortotrópicas, sob as mesmas condições (Dublin, 1991; Custer, Van e Buijs, 1980).

A partir daí, vários trabalhos foram realizados visando a produção de gemas e brotos. Custer, Van e Buijs, (1980), a partir de segmentos nodais de *C. arabica*, 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 al. (1975) observaram o desenvolvimento de brotos em alguns explantes, subcultivados de crescimento de explante de brotações ortotrópicas no meio de Staritsky (1970), suplementado com caseína hidrolizada, vitaminas, e 0,05mg/l de cinetina quando trabalhavam na obtenção de calos.

Cultivos de entre-nós em meio "30K" e "MS" (Murashige e 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%, valores considerados baixos em relação a outras espécies (Dublin, 1980).

Sondahl, Loh e 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 nos 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 e Sondahl (1981) obtiveram, em média, 4,4 plântulas/nó. Ainda os mesmos autores 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.

Berthouly e Echeverry (1987), trabalhando com diferentes linhagens de Catimor, em meio "MS"(Murashige e Skoog, 1962), várias concentrações de sacarose, pH entre 4,6 a 5,6, ácido ascórbico e **BAP**, afirmaram obter novas brotações/explante inicial após 80 dias de inoculação, uma vez estabelecidos os explantes.

Sondahl et al. (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 café 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 μ M, BAP 25 μ M, 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. Fazendo uso do meio de cultura constituído dos sais inorgânicos e vitaminas do meio "B-5" (Gamborg, Miller e Ojima, 1968), inositol, cisteína, 6-BA (50 μ M), AIA (10 μ M), carvão ativado (5g/l), PVP (polivinilpirrolidone) (1 g/l) e agar (9 g/l). Nakamura e Sondahl, (1983) obteve 1,5 novas gemas por nó dos cafeeiros "Icatu", "Catimor" e "Híbrido do Timor", após 60 dias de incubação. O mesmo autor registrou uma taxa de multiplicação de 1,6 gemas/nó para "Conilon" e "Mundo Novo" e 1,7 para "Catuaí".

Em *Coffia arabica*, Sondahl, Nakamura e Sharp, (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.

Barros e Pasqual (1989), 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 0,5mg/l. Os autores ainda afirmam que a presença de ANA é Prejudicial à proliferação de brotos.. Num outro trabalho, estes autores, obtiveram 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 e Pasqual (1990), trabalhando com as concentrações de 0 a 6mg/l de BAP e de 0 a 10mg/l de GA₃, e meio "MS", observaram que o número total de brotos aumenta com o aumento de BAP e diminui com o aumento de GA₃. A maior porcentagem de brotos aptos para o enraizamento foi obtido com 5mg/l de BAP e 10,0mg/l de GA₃.

Forni (1993) obteve maior produção de brotos usando os componentes do meio "MS" acrescido de 6,29 mg/l de BAP com período de incubação de 120 dias. O mesmo autor utilizou explante contendo 2 pares de gemas.

2.2.2 Fungicidas no meio de cultura

O uso de reguladores de crescimento acrescidos aos meios "MS" (Murashige e Skoog, 1962) e/ou "MT" (Murashige e Tucker, 1969) têm sido uma constante em trabalhos de cultura de tecidos do cafeeiro, mais precisamente, na espécie *Coffea arabica* L. Os reguladores de crescimento considerados mais importantes são os do grupo das auxinas e citocininas; resultados mais contundentes são alcançados quando se usa determinado balanço entre ambos, podendo favorecer a calogênese ou rizogênese dependendo da espécie.

Inúmeros são os trabalhos já desenvolvidos com essas substâncias, isoladas ou associadas entre si, ou com outras substâncias acrescidas aos meios para regenerar plantas "in vitro".

Além dos fatores ligados à composição do meio de cultura, as respostas morfo genéticas são alteradas de acordo com as condições as quais são submetidas as culturas (Ramos, 1994).

Dentre estes inúmeros fatores, as contaminações causadas por fungos e/ou bactérias representam grande dificuldade em programas de micropropagação, envolvendo plantas ainda não estabelecidas "in vitro". Para minimizar os problemas de Contaminação algumas tentativas têm sido feitas com a incorporação de produtos ao

meio de cultura ou tratamento do material vegetal. Além de fungicidas também bactericidas são incorporados ao meio (Ramos, 1994).

Tem sido relatado efeito de alguns produtos sobre brotações de plantas cultivadas tanto *in vivo* como "*in vitro*", como exemplo, pode-se mencionar o Benomyl que é absorvido e translocado por células.

O Benomyl é um fungicida sistêmico, sendo absorvido e translocado por células e órgãos vegetais e por isso protege, não só o meio de cultura, mas também o material vegetal da contaminação fúngica (Yang 1976). Além de controlar as contaminações fúngicas, Becker (1971) citado por Yang (1976), observou que esse fungicida possui algumas propriedades reguladoras de crescimento.

Alguns pesquisadores têm trabalhado intensamente no sentido de esclarecer os efeitos de regulador de crescimento em várias culturas e em diversos tipos de tecidos, atribuídos ao Benomyl. O trabalho de Skene (1972) realizado com **soja**, concluiu que a máxima formação de **calos** ocorreu com as dosagens de 25 a 50 mg/L desse produto. Efeito semelhante foi observado com uma dosagem de 0,003 mg/L de cinetina, demonstrando que a cinetina é 5000 vezes mais ativa do que o Benomyl para o desenvolvimento de **calos**.

Alguns trabalhos tem sido feitos no sentido de evidenciar esse efeito de regulador de crescimento, sem o propósito de determinar a natureza da(s) substância(s) que apresenta(m) atividade semelhante a citocinina no preparo comercial.

Moreira (1993), trabalhando com explantes de tangerineira 'Sunki', concluiu que o melhor tratamento para produção de brotos maiores do que 10 mm, foi com a dosagem de 239 mg/L de Benomyl, obtendo-se 6,6 brotos por explante, em média. Enquanto que, Para o número total de brotos a melhor dosagem foi de 242 mg/L com de 9,6 brotos por explante.

Observa-se assim, que há a necessidade não somente de aprofundar-se nos estudos referentes ao Benomyl, como também de outros fungicidas que possam atuar como reguladores de crescimento "*in vitro*". Há evidências de que o Triadimenol, da

mesma forma que o Benomyl, pode exercer influência sobre o vigor de plantas no campo.

San Juan e Matielli (1995), estudando o efeito secundário de alguns defensivos usados via solo (Baysiston GR, Disyston GR 100 e Bayfidan 60GR), verificaram que os tratamentos que continham o Triadimenol (Baysiston GR e Bayfidan 60 GR) apresentaram resultado produtivo superior ao que contem somente dissulfoton (Disyston GR 100), evidenciando ser o Triadimenol o principal responsável pelo efeito tonificante ao cafeeiro observado nos cafezais tratados.

Segundo Andrei (1993), o Triadimenol é um fungicida sistêmico, do grupo dos triazóis com a fórmula β - (4-clorofenoxi)- x - (1,1-dimetil-etil) 1,4, 1,2,4 Aniazole-1-etanol. O Triadimenol é comercializado como bayfidan sendo um concentrado emulsionável, classe toxicológica II, inflamável 1B. Tem efeito preventivo, curativo e erradicativo, apresentando ainda um largo espectro de ação e longo efeito residual. É recomendado para o controle de oídio e ferrugem do café.

2.3 Aclimatização

A cultura de tecidos em café representa um grande potencial a ser explorado como um instrumento para programas de genética e melhoramento. Embora as técnicas convencionais possam ser aplicadas na produção e seleção, haverá situações onde a cultura de tecidos poderá ser unicamente vantajosa. Uma das fases mais críticas da propagação "*in vitro*" é a fase de aclimatização *ex vitro*.

A aclimatização é o processo pelo qual as plantas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com as condições climáticas naturais; essas novas condições devem ser passadas às plantas progressivamente, de forma que elas sofram menores estresses, que podem culminar em injúrias profundas ou mesmo em morte (Brainerd e Fuchigami, 1981).

A manutenção de alta umidade e temperaturas amenas são regras gerais na fase de aclimatização.

Algumas técnicas alternativas tem sido estudadas no sentido de evitar perdas de plantas obtidas "*in vitro*" na aclimatização, como imersão de gemas em meio enraizante e transferência das plantas para outro composto quando aparecem as raízes (Hussey, 1980).

O crescimento e desenvolvimento das plantas dependem da progressiva formação dos tecidos dos órgãos, expansão e diferenciação celular que ocorrem continuamente nas regiões meristemáticas (Slatyer, 1973).

O enraizamento "*in vitro*" é relativamente fácil com espécies herbáceas ou mesmo lenhosas que apresentam grande capacidade de enraizamento na estaquia. Pode-se fazer a indução ao enraizamento "*in vitro*" e deixar que o alongamento ocorra no substrato de transplante, o que leva ao desenvolvimento de um melhor sistema radicular (Zimmerman e Fordham, 1985).

A ação das auxinas 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. À nível celular, as auxinas induzem o aumento da plasticidade parietal (Guevara, 1987). 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 sítios de fixação nos tecidos e serem liberadas só muito depois (Guevara, 1987).

Corrêa (1990), trabalhando com *Malus domestica* cv M-7, observou que períodos maiores de incubação em AIB favorecem a indução a iniciação radicular. Chalfun (1989) observou que em plantas com alto teor de compostos fenólicos, o regulador de crescimento AIB provocou efeito antagônico no desenvolvimento do sistema radicular.

Segundo Sutter e Hutzler (1984), a remoção das plântulas das condições "in vitro" provoca um estresse crítico, sendo então necessário manter a umidade alta e a temperatura amena. A suplementação luminosa e o enriquecimento da atmosfera com CO₂ (aproximadamente 300 ppm) também podem minimizar os problemas e auxiliar algumas espécies de plântulas a passar de heterotróficas a autotróficas.

Grout e Millan (1985), trabalhando com plântulas de couve-flor "in vitro", transferidas para a aclimatização, mostraram que a atividade fotossintética foi insuficiente, ocorrendo desbalanço de carbono nos tecidos palissádicos, e as folhas formadas não estavam suficientemente constituídas para o autotrofismo.

Plântulas de morango, ao serem transferidas para aclimatização, tinham, de acordo com Grout e Millan (1985), baixa taxa de fixação de carbono, uma vez que as folhas formadas "in vitro" não conseguiam se auto-sustentarem suficientemente. O autotrofismo e o aumento subsequente e significativo do número de folhas, bem como uma indução da eficiência dessas folhas, poderiam contribuir para a sobrevivência das plantas.

Foi demonstrado que os estresses sofridos pelas plântulas afetam todos os parâmetros de crescimento, reduzindo, dessa maneira, a produção vegetal. O efeito de qualquer estresse altera os processos de consumo de nutrientes, metabolismo de carboidratos e de proteínas e translocação de íons; as enzimas que são liberadas com interrupção de rotas estão intimamente ligadas aos processos de desenvolvimento nas plântulas (Wardle, Dobbs e Short 1983).

Pierik e Marandí (1987) observaram que plântulas de *Rubus idaeus*, obtidas "in vitro", apresentaram mais área foliar ao serem inoculadas com fungos micorrízicos de gênero *Glomus* e ao serem transplantadas em substrato mineral para casa de vegetação.

Carvalho e Caldini (1984) relatam em seus estudos que o déficit hídrico, decorrido com as estações das secas, levam as plantas a diminuir o número e a expansão das folhas, ficando o sistema radicular enrijecido, delgado e com baixa eficiência.

A fase de aclimatização deve se encerrar logo que as plântulas apresentem eficiência nos órgãos especializados, passando de heterotróficas para autotróficas (Aston e Grout 1977). O número de folhas e área foliar são bons indicativos para acompanhar a capacidade das plântulas de se auto-sustentarem na fase de aclimatização. **As plântulas que** superarem o estresse da aclimatização apresentarão um bom desenvolvimento, enquanto as demais serão portadoras de algum prejuízo fisiológico, culminando com estagnação aparente (Aston e Grout 1977).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1: Propagação vegetativa "in vivo"

O experimento foi realizado no laboratório de cultura de tecidos e casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

As estacas de *café* (*Coffea arabica L.*), cultivar Mundo Novo (LCP 379/19) utilizadas foram provenientes de ramos ortotrópicos, originados da rebrota de plantas adultas recepadas.

Antes da coleta das estacas as plantas foram submetidas a uma adubação foliar com Ácido Bórico, Sulfato de Zinco e Cloreto de Potássio todos a 0,3%, para suprir a deficiência em campo.

As estacas foram retiradas da parte mediana dos ramos ortotrópicos, deixando-as com um comprimento de 6 a 8 cm, contendo apenas um nó, um par de meias folhas e diâmetro de 0,5 cm. No transporte foi utilizada uma solução contendo 150 l de água com 1500 mg do antioxidante polivinilpirrolidone (PVP₄₀), onde as mesmas foram imersas.

As estacas após terem sido coletadas, foram levadas para o laboratório de cultura de tecidos, onde foram deixadas em água corrente por 24 horas e a seguir submetidas aos seguintes tratamentos: antioxidante PVP₄₀ nas concentrações de 0, 500, 1000 e 2000 mg/l; tempo de imersão de 6, 12, 24, 48 horas; posteriormente a base das estacas foi colocada em contato com ácido indol butírico (AIB) na concentração de 100 mg/L, por um tempo de 12 horas e a seguir imersão rápida com Benlate (Benomyl) a 0,1%,

por 2 minutos; utilizou-se também uma testemunha, na qual as estacas não sofreram qualquer tipo de tratamento.

O plantio das estacas tratadas foi feito em bandejas de plástico, preenchidas com substrato convencional para formação de mudas de café (700 l de terra, 300 l de esterco de curral bem curtido, 5 kg de superfosfato simples, 0,5 kg de cloreto de potássio/m³), sendo mantidas em casa-de-vegetação sob nebulização intermitente, a qual funcionava o dia todo, com intervalo de 6 minutos entre as nebulizações que tinham a duração de 10 segundos.

O ensaio foi sombreado utilizando sombrite de cor escura, objetivando reduzir em 50% a incidência de raios solares sobre as estacas.

O substrato foi submetido a um tratamento com o fungicida pentacloronitrobenzeno (8 g/ 15 l água), para evitar a contaminação por fungos de solo.

O delineamento experimental utilizado foi "inteiramente casualizado", em esquema fatorial com 17 tratamentos ($4 \times 4 + 1$) e quatro repetições. Cada parcela constou de 10 estacas (40 estacas/bandeja), espaçadas de 10 cm, totalizando 680 estacas. As repetições foram distribuídas uniformemente ao redor dos bicos nebulizadores (6 bicos).

O ensaio foi avaliado aos 120 dias após o plantio. As plântulas foram retiradas das bandejas com auxílio de um jato d'água, tomando-se o cuidado para não danificar as raízes.

As variáveis analisadas foram: enraizamento de estacas, número de folhas, comprimento de brotos, peso de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular.

A análise estatística realizada foi baseada na metodologia descrita por Pimentel Gomes (1987).

3.2 Experimentos 2 e 3: Propagação vegetativa "in vitro"

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras - MG. O material vegetal utilizado foi *Coffea arabica* L. cv. Catuaí 2077-2-5-44 cujas plântulas já se encontravam estabelecidas "in vitro" com cerca de 6 meses de idade e aproximadamente 4 a 6 pares de folhas / broto.

O meio de cultura básico foi o 'MS' (Murashige e Skoog, 1962) gelificado com ágar na proporção de 7 g/L. O pH foi ajustado para 6.1 antes da autoclavagem.

No experimento 2 utilizaram-se frascos tipo azeitona, fechados com tampa plástica sem rosca, adicionando-se em cada frasco 40ml de meio. No experimento 3 foram usados tubos de ensaio com dimensões de 25x150mm, fechados com tampa plástica. Em cada tubo adicionou-se um volume de 10ml de meio.

Os instrumentos utilizados no preparo dos explantes e inoculação, tais como: bisturis, lâminas, pinças, durante a execução dos trabalhos, foram mantidos em tubos de ensaio contendo álcool 70% mais bactericida Quemicetina. **Os** explantes eram separados dentro de placas de petri com papel filtro.

Para a esterilização dos meios e dos materiais de inoculação usou-se autoclave tipo horizontal de vapor úmido com 121°C de temperatura e 1atm de pressão por 20 minutos.

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

Os explantes foram retirados de plântulas isentas de contaminantes, separados sobre placas de petri, deixando-se explantes com 2 pares de folhas e gemas.

As condições de cultivo, na sala de crescimento, foram fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2.000 lux, temperatura de 26°C e umidade relativa de aproximadamente 26%. **Os** experimentos foram analisados aos 120 dias após a inoculação, através das características número total de brotações (experimento 2 e 3),

número de brotações ≥ 1 cm(experimento 2 e 3), peso de materia seca da parte aérea (experimento2) e comprimento médio de brotos(experimento 3)

O delineamento experimental utilizado no experimento 2 foi inteiramente casualizado (DIC) e no experimento 3 foi **blocos** casualizados (DBC), ambos em esquema fatorial.

Experimento 2: concentrações de BAP x Concentrações de Benomyl

- 0,0 mg/L- 3,0 mg/L- 6,0 mg/L- 9,0 mg/L de BAP
- 0,0 mg/L- 100,0 mg/L- 200,0 mg/L-300,0mg/L- 400,0 mg/l de Benomyl
- Fatorial: 4x5 com 5 repetições de 1 frasco/parcela e 3 explantes/frasco.

Experimento3: concentrações de BAP x concentrações de Triadimenol

- 0,0 mg/L- 3,0 mg/L- 6,0 mg/L- 9,0 mg/L de BAP
- 0,0 mg/L- 100,0 mg/L- 200,0 mg/L-400,0 mg/L de Triadimenol
- Fatorial: 4x4 com 4 repetições de 4 tubos por Parcela e 1 explante/tubo.

3.3 Experimento4: Aclimatização de brotos produzidos "in vitro"

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

O material vegetal utilizado foram brotações micropropagadas " "in vitro" " de *Coffea arabica* L. cv. Catuai 2077-2-5-44 em meio " MS " suplementado com 10 mg/L de GA_3 (ácido giberélico). **Após** apresentarem 3 a 4 cm, as brotações foram retiradas dos tubos de ensaio. **Os** tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de AIB (0, 10, 20, 40 mg/L), nas quais a base das brotações foi imersa por diferentes períodos de tempo (0, 12, 24 horas). **Após** o tratamento, as brotações foram transferidas para bandejas de isopor (72 células) contendo substrato plantimax e levadas para casa de vegetação com umidade controlada por sistema de nebulização automática e

temperatura em torno de 25° C. Cada broto recebeu semanalmente 1 ml da solução nutritiva de Hoagland (1950).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial **4 x 3** com **4** repetições e 3 plantas por parcela. **As** avaliações foram realizadas 120 dias após a inoculação dos explantes. Foram avaliadas as seguintes características: comprimento da parte aérea(cm), **peso** da matéria fresca da parte aérea **e** do sistema radicular(**g**) e comprimento **de** raízes (an).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1: Progagação vegetativa “in vivo”

Os dados referentes a análise de variância para as características número de folhas por estaca, comprimento de brotos, enraizamento de estacas, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular são apresentados no Quadro 1.

Para efeitos estatísticos a testemunha não foi incluída nos resultados, uma vez que neste tratamento as estacas sofreram ação da oxidação fenólica, comum a outras espécies como *Syringa vulgaris* (Bojarczuk, 1978, citado por Chalfun, 1989) e todas as estacas perderam a viabilidade após 15 dias da instalação do experimento.

Houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, para a característica vingamento de estacas (PVP e tempo). Ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F, os tratamentos diferiram significativamente para as características peso da matéria fresca e seca do sistema radicular (Quadro 1).

QUADRO 1 - Análise de variância para as características número de folhas por estaca, comprimento de brotos, enraizamento de estacas, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Causas da variação	G L	Quadrados Médios						
		Número de folhas por estaca	Comprimento médio de brotos	Enraizamento de estacas	Peso da matéria fresca		Peso da matéria seca	
					Parte Aérea	Sistema radicular	Parte Aérea	Sistema radicular
PVP	3	1,00682	0,25116	3.924,04**	19.983,54	75.497,32*	424.603	3.699,13*
Tempo	3	0,35757	0,88139	2.073,16**	9,726,084	12.029,89	1.544,08	915,268
PVPxTempo	9	1,10686	0,47917	473,763	108.548,02	15.999,07	10.609,05	611,974
Resíduo	48	1,07025	0,59849	251,531	188.058,09	23.399,61	14.065,32	832,411
C. V. (%)		32,87	50,60	34,95	40,46	73,95	44,54	81,51

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

(**) Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.1.1. Enraizamento de estacas

A Figura 1 mostra um significativo aumento no enraizamento desde a dosagem 0 mg/L (sem PVP40) até o tratamento que apresentou o maior percentual de enraizamento de estacas, o que ocorreu quando da utilização de 330 mg/L do antioxidante (PVP40), registrando-se 68% de estacas enraizadas. A partir desta concentração evidenciou-se tendência de decréscimo do enraizamento a medida que as concentrações de PVP40 atingiram 1600 mg/L, obtendo-se nesta concentração apenas 5%.

antioxidante (PVP40), registrando-se 68% de estacas enraizadas. A partir desta concentração evidenciou-se tendência de decréscimo do enraizamento a medida que as concentrações de PVP40 atingiram 1600 mg/L, obtendo-se nesta concentração apenas 5%.

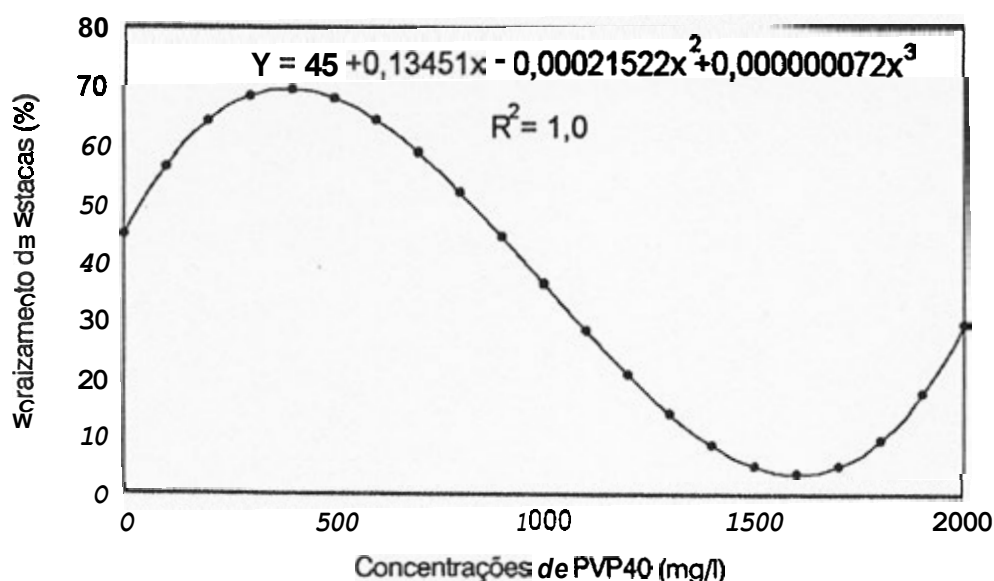


FIGURA 1 - Análise de regressão entre enraizamento de estacas e concentrações de PVP40. UFLA, Lavras-MG, 1995.

Em concentrações mais elevadas (acima de **1600 mg/L**) observou-se necrosamento da base das estacas, e uma retomada do processo de enraizamento, sendo que neste caso, a rizogênese ocorreu acima da área de imersão das estacas.

Os resultados obtidos para esta característica discordam, em parte, dos descritos por Putushotham e Vishveshwara (1980), Arcila-Pulgarin e Valencia-Aristizabal (1976) e Van De Vossen e Op De Laak (1976), os quais afirmam que para o enraizamento de estacas de *Coffea arabica L.* não há necessidade de um tratamento químico. A discordância para com os resultados destes autores não é total, uma vez que obteve-se

quanto da dosagem 0 mg/L (ausência de PVP40) aproximadamente 45% de estacas enraizadas, índice relativamente alto para uma espécie de difícil enraizamento.

Segundo Nemeth (1986), Haissig (1982), Thompson e Thorpe (1987) o vingamento de estacas é regulado por uma série de fatores (nutrição das plantas fornecedoras de estacas, reguladores de crescimento, idade das estacas, época de coleta, entre outros) e a ausência de qualquer um deles pode limitar o processo.

Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos, onde também utilizou-se de antioxidante visando evitar a oxidação de propágulos vegetativos. Coccozza, Kasecker Júnior e Pinto (1995) verificaram a ineficiência de antioxidantes, entre eles o PVP40, na propagação "in vitro" de *Dioscorea alata*.

Houve significância também para o fator tempo de imersão, como pode ser verificado no Quadro 1.

Pode-se observar através da Figura 2, que o tempo de imersão exerceu influência sobre o enraizamento das estacas, Quando as estacas ficaram imersas por um período de 6 horas, obteve-se um percentual de 53%, sendo que este percentual foi diminuindo à medida que o tempo de imersão foi aumentando até 48 horas, com isto reduzindo o percentual de enraizamento de 53 para 32%.

Verificou-se que houve efeito antagônico àqueles esperados já que o aumento do período de imersão causou diminuição do enraizamento das estacas. Fica demonstrado que as estacas podem ser colocadas em imersão por 6 horas, onde ocorreram os maiores percentuais de enraizamento.

Segundo Hartmann e Kester (1990), é imprescindível que a estaca esteja em condições fisiológicas adequadas e que sejam fornecidas condições favoráveis de ambiente, como também um bom arejamento do meio, sendo associado com os efeitos indesejáveis no início da rizogênese observados nas estacas de café.

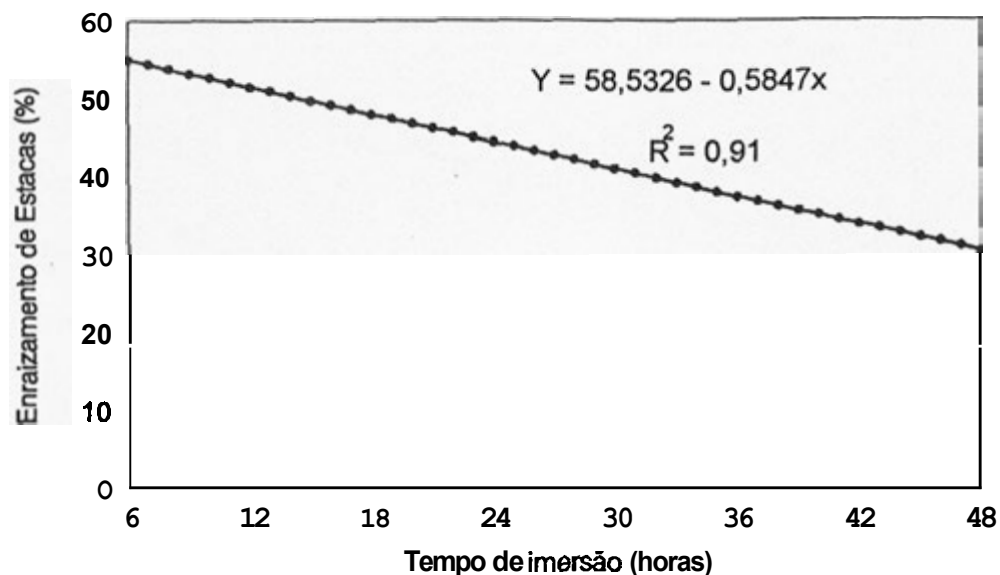


FIGURA 2 - Análise de regressão entre enraizamento de estacas e tempo de imersão. UFLA, Lavras-MG, 1995.

4.1.2. Peso da matéria fresca do sistema radicular

Observa-se no Quadro 1 que houve diferença significativa apenas para o fator PVP, ao nível de 5% de probabilidade.

O maior acúmulo de matéria fresca do sistema radicular ocorreu a 350 mg/L de PVP40, quando atingiu-se 300 mg (Figura 3). Este dado é relativamente maior que aquele registrado quando da utilização da dosagem 0 mg/L do antioxidante (240mg). A partir deste ponto ocorreu uma diminuição do acúmulo de matéria fresca com o aumento das concentrações do antioxidante até 1500 mg/L. Acima desta concentração,

da mesma forma que ocorreu com enraizamento de estacas, a curva esboçou reversão da tendência de queda, mostrando inclusive aumento significativo.

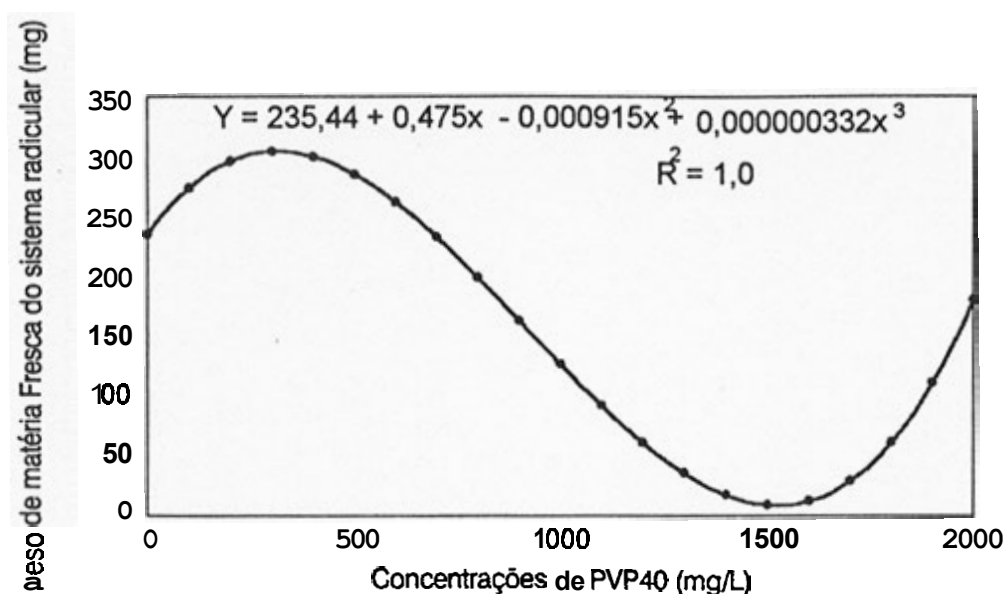


FIGURA 3 - Análise de regressão entre **peso** da matéria fresca do sistema radicular e concentrações de PVP₄₀. UFLA, Lavras-MG, 1995.

Poucas citações existem sobre a propagação por estacas utilizando antioxidantes, conforme afirmam Fachinello et al. (1993). Em um desses trabalhos Coutinho et al. (1992) obtiveram bons resultados utilizando 5000 ppm de AIB + 500 ppm de PVP na propagação de *Feijoa selowiana* Berg.

4.1.3 Peso da matéria seca do sistema radicular

A característica peso da matéria seca do sistema radicular foi influenciada estatisticamente apenas pelo fator PVP, como pode ser visto no Quadro 1.

Ocorreu resposta cúbica para a variação dos dados obtidos (Figura 4). Por esta mesma figura percebe-se que o maior acúmulo foi registrado com 400 mg/L do antioxidante, atingindo-se 57 mg de matéria seca, superior aos valores apresentados pela dosagem de 0 mg/L (PVP40). A partir deste ponto ocorreu um decréscimo até 1500 mg/L, onde pela Figura 4, observa-se valores negativos de matéria seca. O efeito deletério do uso do PVP40 é amenizado em concentrações maiores que 1500 mg/L, ou até deixa de existir, uma vez que em 2000 mg/L obtiveram-se resultados similares ao da dosagem 0 mg/L.

Para que ocorra um bom enraizamento das estacas, e conseqüentemente um maior acúmulo de matéria seca, é imprescindível que a estaca esteja em condições fisiológicas adequadas, e que sejam fornecidas condições favoráveis de luz, umidade, temperatura do ar e do substrato, como também um bom arejamento do meio (Hartmann e Kester, 1990).

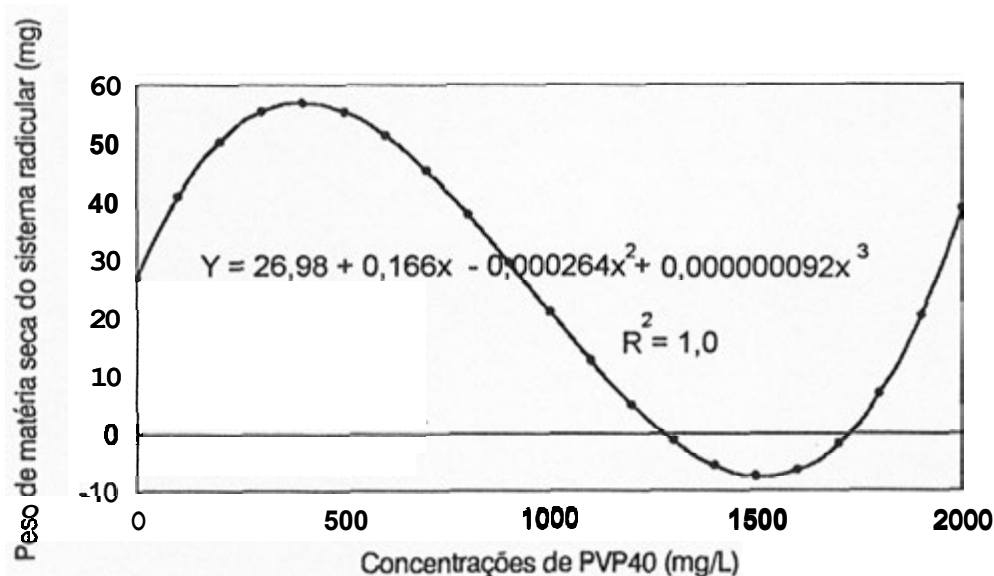


FIGURA 4 - Análise de regressão entre peso da matéria seca do sistema radicular e concentrações de PVP₄₀. UFLA, Lavras-MG, 1995.

4.2 Experimento2 : Concentrações de BAP x Concentrações de Benomyl

Pelos resultados apresentados no Quadro 2, observa-se que para a característica comprimento médio de brotos não houve efeito significativo tanto para BAP como para Benomyl.

QUADRO 2: Análise de variância dos dados de comprimento médio; número total e número de brotos iguais ou maiores a 1 cm em explantes de *Coffea arabica* L. cultivados "in vitro", UFPA, Lavras -MG, 1995.

Causas da variação	G.L.	Quadrados Médios		
		Igual ou maior	Total	Comprimento de brotos
Benomyl	4	6,89	8,49	0,3073
BAP	3	27,2**	100,33**	0,665
BAP x Benomyl	12	5,25	7,063	0,7037
Residuo	80	3,75	8,265	0,7227
C.V. (%)		56,01	51,98	66,60

** Significativo ao nível de 1%, pelo teste F.

Para as características número de brotos iguais ou maiores a 1cm e número total de brotos observou-se efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade apenas para o fator BAP, não ocorrendo efeito do Benomyl para essas variáveis. Estes resultados diferem daqueles apresentados por Moreira (1993), que obteve efeito significativo para Benomyl em número de brotos iguais ou maiores a 1 cm em *Citrus sunki*, demonstrando tendência de incremento deste fator com o aumento da concentração do produto até 100 mg/L, decrescendo com concentrações mais elevadas (150 mg/L). Constatada a significância para BAP, procedeu-se o estudo da análise de regressão para as características avaliadas. Com o aumento da concentração de BAP ocorreu um acréscimo linear do

número de brotos iguais ou maiores a 1 *cm*. Estes resultados corroboram afirmações de Forni (1993), a qual afirma que elevando as concentrações de BAP há um aumento do número de brotos iguais ou maiores que 1 *cm* para *Coffea arabica*.

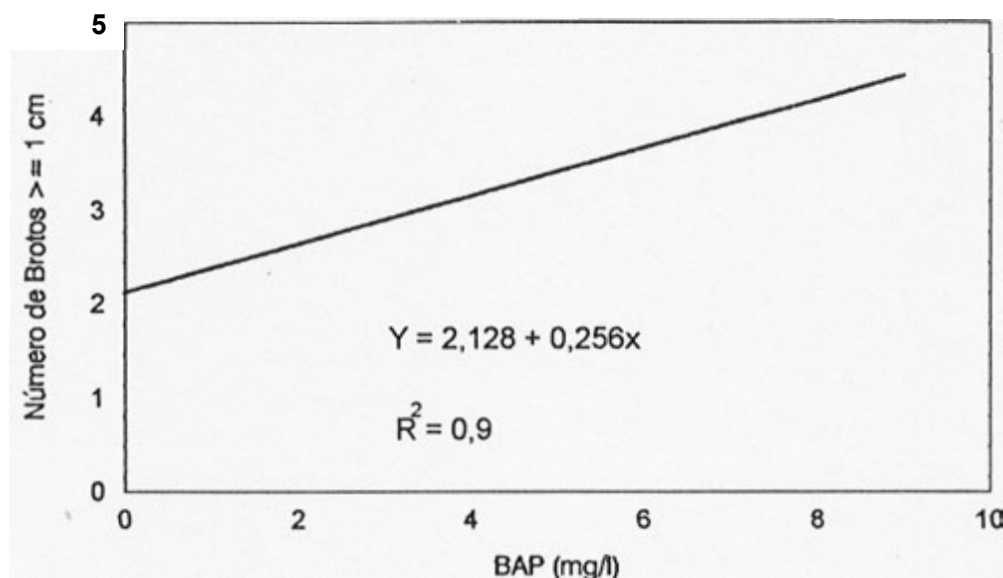


FIGURA 5: Número de brotações maiores ou iguais a 1 cm em explantes de *Coffea arabica* L., como função de doses de BAP adicionadas ao meio de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Para o efeito de BAP sobre número total de brotos de *Coffea arabica*, verifica-se pela Figura 6, que com o aumento da concentração de BAP até 6 mg/L ocorreu um aumento progressivo da característica, atingindo o ponto máximo a 7,59 mg/L com posterior decréscimo. Moreira (1993) avaliando o efeito de BAP e Benomyl sobre o

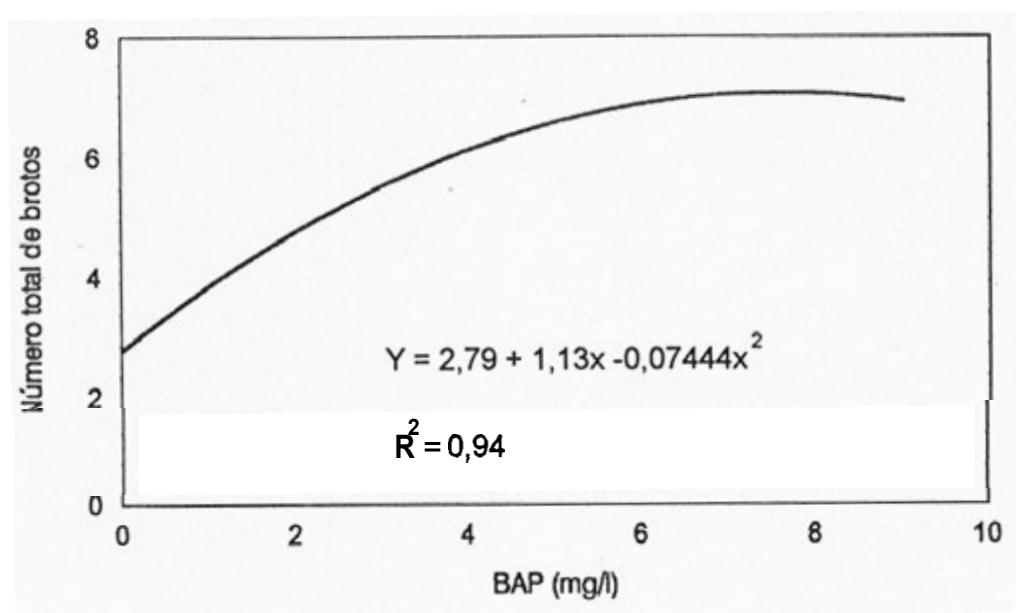


FIGURA 6 : Número total de brotações em explantes de *Coffea arabica* L., como função de doses de BAP adicionadas ao meio de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1995.

número total de brotos de *Citrus sunki* propagado "in vitro", observou efeito dos dois fatores estudados e interação entre eles, e verificando ainda que quando utilizou doses crescentes de Benomyl na ausência de BAP, ocorreu aumento no número de brotações e que o ponto máximo da concentração de BAP ocorreu à 2,08 mg/L, com 100 mg/L de Benomyl, correspondendo a **18** brotações.

Esperava-se um efeito positivo do Benomyl sobre a proliferação de brotos do cafeeiro, pois, segundo observações visuais, quando da aplicação deste produto em plantas no campo, estas se apresentam com **enfolhamento** mais abundante e a coloração verde das mesmas é mais acentuada. Esta expectativa existia também pelo fato de que com *Citrus sunki* o efeito demonstrado pelo Benomyl em plantas no campo foi confirmado sobre a proliferação de brotos em laboratório (Moreira, 1993).

As diferenças registradas entre as duas espécies podem ser atribuídas a peculiaridade da própria espécie. Ao fazer uma análise da resposta de ambas às aplicações de BAP "in vitro", verifica-se maior exigência quanto à concentração e quanto ao tempo para apresentar esta resposta, por parte do cafeeiro em relação a *Citrus sunki*. Como o Benomyl possui um radical de citocinina e considerando-se que este radical seria o responsável pelo efeito sobre a proliferação de brotos, esta poderia ser a explicação para a diferença ocorrida entre *Coffea arabica* e *Citrus sunki* (Moreira, 1993).

4.3 Experimento3:Concentrações de BAP x concentrações de Triadimenol

Verifica-se pela análise de variância (Quadro 3) que houve interação significativa entre os fatores Triadimenol e BAP, bem como em ambos individualmente, para as características número total de brotos e peso da matéria seca. Para número de brotos = ou > 1cm houve significância apenas no fator Triadimenol.

Quadro 3: Análise de variância para as características número total de brotos, número de brotos iguais ou maiores a 1cm e peso da matéria seca da parte aérea de *Coffea arabica* cv. catuai.

C.V.	GL	Quadrados		Médios
		Número de total	Brotos = > 1cm #	Peso da Materia Seca #
BAP	3	294,6406**	0,1074	0,0018**
TRIADI- MENOL	3	2.380,3072**	2,2747**	0,0192**
BAP x TRIADIM.	9	241,1406**	0,1281	0,00078**
BLOCO	3	4,8906	0,0530	0,00013
C.V(%)		26,80	28,78	1,16

Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Analisando-se as Figuras 7 e 8 verifica-se que a interação evidenciou maior número de brotações, e maiores valores para peso da matéria seca, respectivamente na concentração de 9 mg/L de BAP e ausência do fungicida Triadimenol. Estes resultados não descartam a suspeita levantada por Matielli, San Juan e Matiello (1993), que atribuem a melhoria nas mudas de cafeeiro pulverizadas com Triadimenol a associação do controle de *Cercospora* com o efeito "tônico" do produto na planta. Desta forma, novos estudos devem ser feitos no sentido de elucidar melhor o comportamento do fungicida Triadimenol "in vitro". Se adicionado em concentrações menores ou associado a outros reguladores talvez possa apresentar melhores resultados.

Verifica-se na figura 7 e 8 que, usando-se somente BAP, maiores valores foram alcançados tanto para número total de brotos como, para peso da matéria seca, na medida que suas concentrações foram aumentadas. A resposta positiva para ambas as características ocorreu a 9 mg/l, concordando com os resultados de Forni (1993), também em *café*.

Ao mencionar o efeito do Triadimenol sobre o número de brotos maiores ou iguais a 1cm, verifica-se pela Figura 9 que à medida que aumentaram as concentrações do Triadimenol ocorreu efeito inverso nos explantes, resultando em inibição do produto. A interferência negativa exercida pela presença do produto no meio de cultura foi encontrada também por Ramos (1994), que trabalhando com brotos de citros concluiu ser o produto não eficiente em promover a proliferação de brotos na propagação "in vitro".

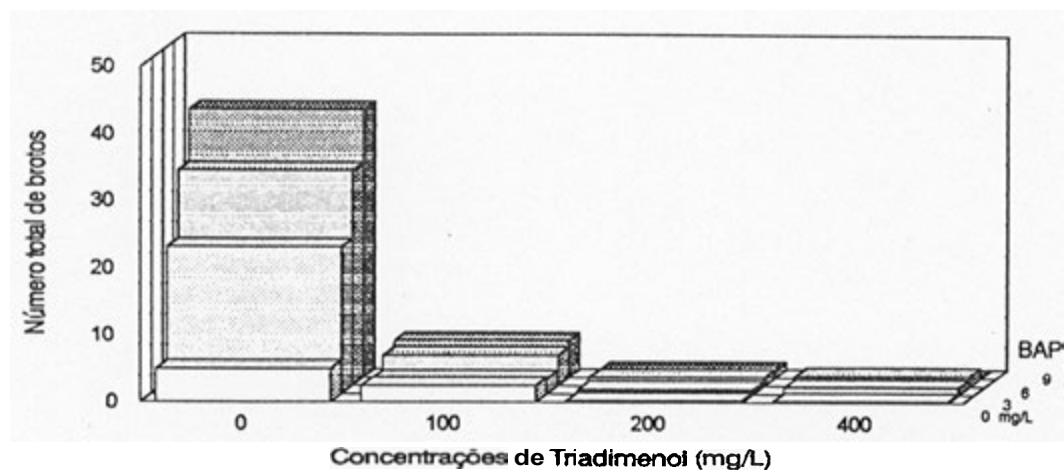


Figura 7: Efeito da interação Triadimenol e BAP para a característica número total de brotos. UFLA, Lavras - MG, 1995.

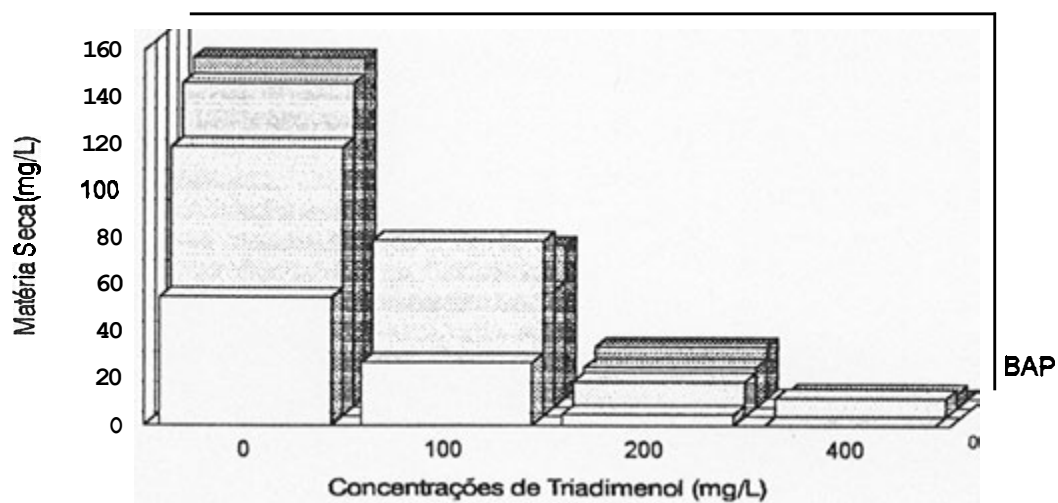


Figura 8: Efeito da interação Triadimenol e BAP na característica matéria seca da parte aérea. UFLA, Lavras - MG, 1995.

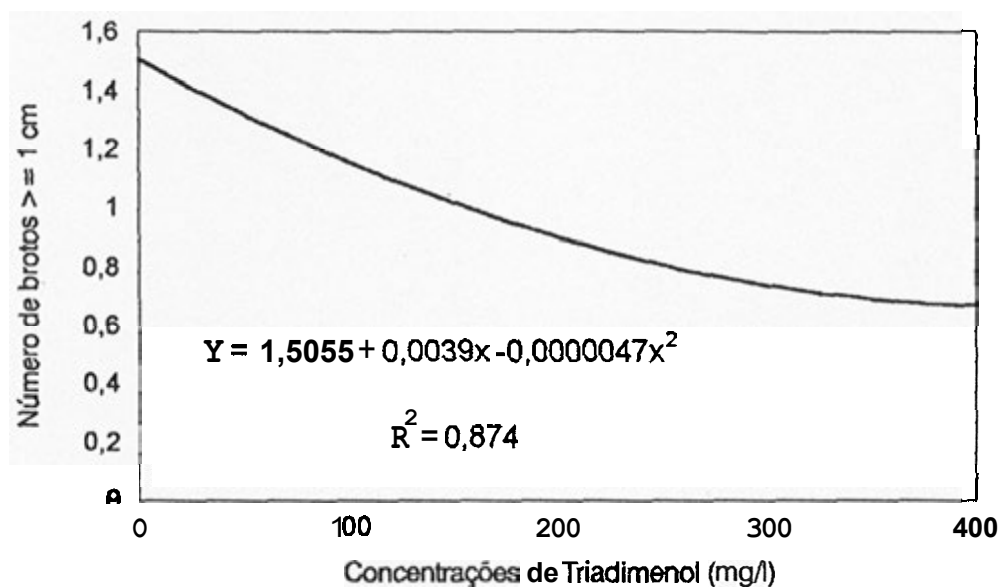


Figura 9: Efeitos das concentrações de Triadimenol sobre o número de brotos iguais ou maiores a 1 cm. UFLA, Lavras - MG, 1995.

4.4. Experimento 4: Aclimatização de brotos produzidos "in vitro".

Pode-se observar pelo Quadro 4 que não houve diferença significativa para peso da matéria fresca da raiz e da parte aérea, demonstrando que não houve efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e dos períodos em que o material permaneceu em imersão sobre estas características. Por outro lado, para altura de plantas e comprimento de raízes foi observado significância para a interação AIB e tempo de imersão, resultado que justificou a análise de regressão para a interação.

QUADRO 4: Análise de variância para as características altura de plantas, comprimento de raízes (CR), peso da matéria fresca do sistema radicular (PMFSR), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA) de *Coffea arabica* L. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Causas da variação	G.L.	Quadrado		Médios	
		Altura de Planta	C.R.	PMFSR	PMFPA
Tempo	2	4,7832**	4,4732*	0,0007	0,000108
AIB	3	5,3303**	3,7937	0,0002	0,000288
Tempo x AIB	6	3,5819**	3,8015'	0,0009	0,000620
Resíduo	36				
C.V. (%)		40,091	16,728	72,539	35,475

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Para a característica altura de plantas observou-se na interação, efeito do tempo de imersão dentro de cada concentração de AIB, apenas diferença dentro de 40 mg/L do regulador. Em períodos superiores a 12 h, observou-se um aumento substancial no desenvolvimento da parte aérea. Este resultado pode ser notado pela Figura 10, onde se evidencia que concentrações mais elevadas do regulador, por 24h de imersão, proporcionaram maior desenvolvimento da parte aérea.

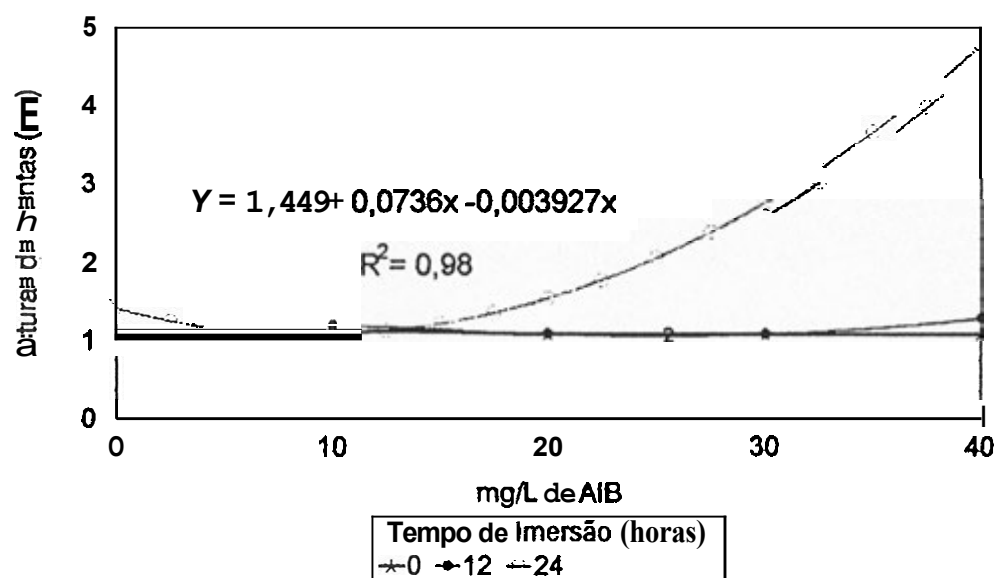


FIGURA 10: Efeito dos tempos de imersão na altura de plantas de *Coffea arabica* L. aclimatizadas em relação as concentrações de AIB. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Para comprimento de raízes, a imersão das brotações em água por 24 h favoreceu o crescimento radicular (8,34 cm) em relação às demais concentrações de AIB utilizadas (Figura 11). Esses resultados podem ser devidos a lixiviação de compostos fenólicos provocados pela permanência dos explantes em água destilada. Segundo Chalfun (1989), a presença de compostos fenólicos endógenos pode ter efeito antagônico ao AIB provocando redução no enraizamento. Esses resultados são contrários aos apresentados por Corrêa (1990), pois segundo este autor, períodos mais longos de incubação com AIB favorecem a iniciação radicular em *Malus domestica* cv. M-7. Esta metodologia deve ser aprimorada para as espécies que necessitem de reguladores de crescimento para o enraizamento, pois estas substâncias podem tornar-se prejudiciais ao desenvolvimento posterior das raízes em concentrações elevadas.

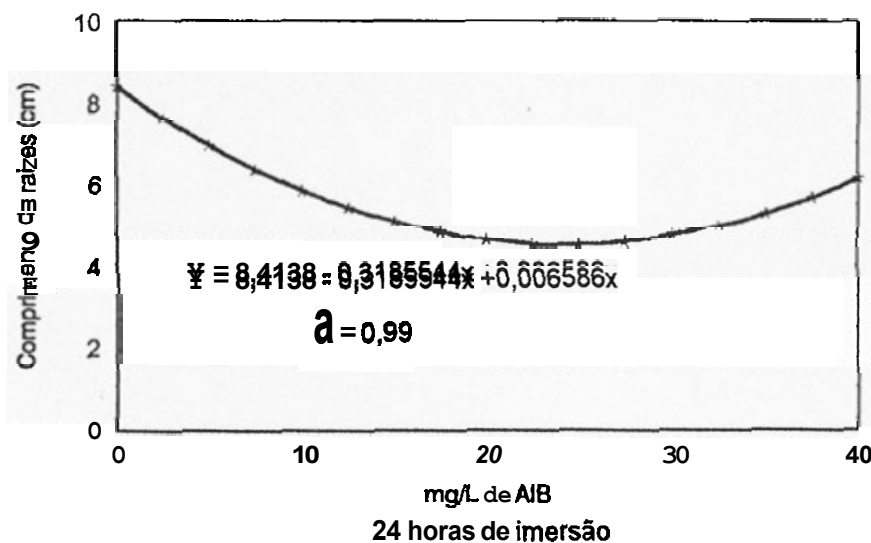


FIGURA 11: Efeito das concentrações de AIB no comprimento de raiz das mudas de *Coffea arabica* L. aclimatizadas em relação a imersão por 24 hs. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Segundo este mesmo autor, a imersão em concentrações de 10 e 20 mg/L de AIB, deve ser realizada por alguns segundos. Estes resultados confirmam os de James e Thurbon (1981), onde a incubação dos explantes em uma determinada concentração de AIB por curto espaço de tempo, com posterior remoção para um meio sem regulador, é suficiente para induzir a iniciação radicular.

5 CONCLUSÕES

Para as condições em que os experimentos foram conduzidos pode-se concluir que:

- 1) O antioxidante PVP40 foi melhor na dosagem 330 mg/l durante 6 horas para a cultivar Mundo Novo (LCP - 379/19), apresentando um percentual de enraizamento de 68%;
- 2) O BAP foi melhor a 9 mg/L na ausência de Benomyl e Triadimenol tendo este demonstrado efeito negativo para a cv. Catuaí 2077-2-5-44;
- 3) A melhor concentração foi 40 mg/L de AIB por 24 horas para o crescimento das plantas, não alterando a matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular para a cv. Catuaí 2077-2-5-44.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDINI, W.I.; MORLATS, R.M. Vegetative propagation of selected ecotypes of *Eucalyptus camaldulensis* DEHN. **Acta Horticulturae**, La Plata, v.227, p.284-286, 1988.
- ANDRÉ, M. Observations sur Le orthotropisme est le plagiotropisme des rameaux chez *Coffea arabica* L. **Cafe, Cacao, Thé**, França, v.27, n.2, p.125-128, abr/jui. 1983.
- ANDREI, C. **Compêndio de defensivos agrícolas**, guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 4ed, São Paulo, 1993, 448p.
- ARCILLA-PULGARIN, J.; VALENCIA-ARISTIZABAL, G. Enraizamento de estacas de café (*Coffea arabica* L.). **Cenicafé**, Caldas, v.27, n.3, p.135-139.1976.
- ASTON, M.J. ; GROUT, B.W. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edinburg, v.17, p.1-7, 1977.
- 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, v.32,p.717-724, 1975.
- BARROS, I.; PASQUAL, M. Efeito de citocinina e giberilina no cultivo "in vitro" de segmentos nodais de *Coffea arabica* cv. Catuaí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 16, Espírito Santo do Pinhal, 1990. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1990. p.11.
- BARROS, I.; PASQUAL, M. Aç30 de fitohormônios na indução e alongação de brotações micropropagadas de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, Maringá, 1989. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989.p.56-57.
- BERTHOULY, M. ECHEVERRI, J.H. Multiplicación asexual de diferentes líneas de catimores: indución "in vitro" de yemas axilares latentes. In CONGRESSO LATINOAMERICANO DE TECNOLOGIA CAFEEIRA, 1, Campinas, 1987. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1987. p.279-283.

- BRAINERD, KE.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured plants to low relatively humidity. *Journal of American Society for Horticultural Science*. Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, July 1981.
- CAMBRONY, H.D.; SNOECK, J. Hormones et regulateurs de croissance dans les cultures de caféiers et de cacaoyers. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v. 27, n.2, p.113-119, Jul. 1983.
- CARTER, K.K. Rooting of tamarack cuttings. *Forest Science*, Washington, v.30, n.2, p.392-394, June 1984.
- CARVALHO, A.; KRUG, C.A.; MENDES, J.E.T. O dimorfismo dos ramos em *Coffea arabica* L. *Bragantia*, Campinas, v.10, n.1, p.151-159, Jan. 1950.
- CARVALHO, D. de; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura "in vitro" de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN. *Ciência e Prática*, Lavras, v.14, n.1, p.97-106. Jan./Abr.1990.
- CARVALHO, M. M. ; CALDINI, L. A Influência da altura e época de poda para aproveitamento de mudas de cafeeiro *Coffea arabica* L. em condições de viveiro, *Ciência e Prática*, Lavras, v.8, n.1, p.25-31, Jan./Jun. 1984.
- CHALFUN, N.N.J. Fatores bioquímicos e fisiológicos no enraizamento de estacas de *Hibiscus rosa sinensis* L. Viçosa: UFV, 1989. 85 p.(Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- COCOZZA, F.D.M.; KASECKER JÚNIOR, J.; PINTO, J.E.B.P. Efeito de antioxidante na micropropagação in vitro de cará (*Dioscorea alata*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, Lavras, 1995. **Resumos...** Lavras: UFLA, 1995. p.194.
- CORRÊA, D.de M.; **Enraizamento "in vitro" de porta enxertos** de macieira (*Malus domestica* Borkh). Lavras: ESAL, 1990, 50p. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia).
- COUTINHO, E.F.; KLUGE, R.A.; JORGE, R.O.; HARTEK, J.A.; SANTOS FILHO, B.G.; FORTES, G.R.L. Efeito do ácido indolbutírico e antioxidante na formação de calos em estacas semilenhosas de goiabeira serrana. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.14, n.3, p.141-143, 1992.

- CROCOMO, O.J.C.; CARVALHO, P.C.T. de; SHARP, W.R.; BANDEL, G. Controle hormonal da diferenciação de tecido de café cultivado "in vitro". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 26, Rio de Janeiro, 1975. **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de botânica, 1975. p.175.
- 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. **Proceedings...**, Paris, ASIC, 1980, v.2, p.586-96.
- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation: **tecnology and aplication**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.?-13.
- DOMINGO, B.S.; CATABAY, F.G. An experiment on the use of hormone in the propagation of coffee by cuttings. **Araneta Journal of Agriculture, Malabou**, v.8, p.28-38. 1961.
- DUBLIN, P. Multiplication végétative "in vitro" de L' arabusta. **Café, Cacao, Thé**, França, v.24, n.4, p. 281-290, oct/déc. 1980.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amelioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**. França, v.28, n.4, p.231-244, oct/déc. 1984.
- DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea e cacao. In: ROCA, N.M.; MROGINSKI, L.A. ed. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, **Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.621-642.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; MENEZES, A.L.; NACHTIGAL, J.C. Efeito do ácido indolbutírico e PVP no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Pisidium cattleyanum* Salsine) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.4,n.1, p.289 1993. (Resumo).
- FIESTER, D.R. **Summary of propagation of coffee by cuttings**. Turrialba, s.d. 1953. 3p. (Comunicaciones de Turrialba).
- FORNI, R.C. Níveis de "MS", BAP, número de gemas do explantes e periodo de repicagem na produção de brotos, folhas e matéria sew e, níveis de 2,4-D e cinetina para tamanho e fenótipo dos calos de *Coffea arabica* L. cv. **Catuai Vermelho CH 207-2-5-44**. Lavras: ESAL, 81p. 1993 (Dissertação de Mestrado em Fitotemia).

- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, New York: v.50, p.151-158. 1968.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. *Advances in plant sciences. Adventitious root formation in cuttings*. Oregon: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.117-131.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. England: Eastern Press, 1984. 709p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas; Parte II Técnicas Básicas*. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA - CNPH, 1990. p.99-170.
- GROUT, B.W.; MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annals of Botany*, London, v.55, p.129-154, 1985.
- GUEVARA, E.B. Reguladores de crescimento. In: *II Curso de cultivo de tejidos*. Turrialba, 1987. p.58-79.
- HAISSIG, B.E. Carbohydrate and amino acid concentrations during adventitious root primordium development in *Pinus banksiana* Lamb. cutting. *Forestry Science*, Washington, v.28, n.4, p.813-821, Dec. 1982.
- HAISSIG, B.E. Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. In: JACKSON, M.B. *New root formation in plants and cuttings*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.141-190.
- HAISSIG, B.E.; RIEMENSCHNEIDER, D.E. Genetic effects on adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. *Advances in plant sciences: Adventitious root formation in cuttings*. Oregon: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.47-60.
- HARTMANN, H.T.; ESTER, D.E. *Plant propagation: principles and practices*. 3.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. 661p.
- HARTMANN, H.T.; ESTER, D.E. *Propagacion de plantas. principios y practicas*. Ciudad del Mexico: Continental, 1990. 810p.
- HOAGLAND, D.R. ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soli. *California Agriculture*, Berkeley, p.375, 1950.

- HOSTALACIO, S.; SOARES, A.,; COELHO, J. Enraizamento de estacas de Azaléa (*Rhododendron* spp.), Três Marias (*Bongainvillea spectabilis*) e Mino de Vênus (*Hibiscus rosasinensis*) sob influência de ANA e IBA. **Ciência e Prática**, Lavras, v.1, n.1, p.30-35, jan/jun, 1977.
- HUSSEY, G. In vitro propagation of some numbers of the liliaceae, iridiaceae and amarilidaceae. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.78, p.303-309, 1979.
- HUSSEY, G. In vitro propagation. In: INGRAM, D.S. **Tissue culture methods for plant pathologists**. Oxford, Blackwell Scientific publications, p.51-61, 1980.
- IGBOANUGO, A.B.I. Rooting of lignotubers of some Eucalyptus with indole 3 butiric acid. **Pakistan Journal of Forestry**, Nigeria, v.37, n.3, p.121-124, 1987.
- JAMES, D. J.; THURBON, I. J.; Shoot and root initiation "in vitro" in apple root -stock M-9 and the promotive effects of phloroglucinol. **Journal of Horticultural Science**, London v.56, n.1, p.15-20, Jan. 1981.
- KRIKORIAN, 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.
- LEON, J. **Fundamentos botânicos de los cultivos tropicales**. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 1968. p.229-230. (Série Texto y Materiales de Enseñanza, 18).
- LEOPOLD, A.C.; KRIEDEMANN, P.E. **Plant growth and development** 2.ed., New York :McGraw Hill, 446 p. 1975.
- LIRA, L.M. **Efeito de substratos e do superfosfato simples no limoeiro (*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo) até a repicagem**. Lavras: ESAL, 1990. 86p. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia).
- LONDOÑO, M.E.A. de; PIZZINI, W.R.; RODRIGUEZ, J. Cultivo de meristemas de café, **Cenicafé**, Colômbia, v.38, n.3, p.106-111, jul/sep. 1981.
- MARTINS, A.B.G. **Uso de reguladores de crescimento no enraizamento de estacas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)** Viçosa: UFV, 1985. 83p. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia).
- MATIELLE, A; SAN JUAN, R.C.C.; MATIELLO, J.B. Modos de aplicação e doses de triadimenol, com ou sem dissulfoton no plantio do cafeeiro, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 19, Três Pontas, 1993. Resumos... Rio de Janeiro: MAARA/PROCAFE, 1993. 123-124p.

- 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, Avi 1983, p.157-194.
- MILLER, N.F.; HINESLEY, L.E.; BLAZICH, F.A. Propagation of fraser fir by stem cuttings: effects of type of cutting, length of cutting, and genotype. *HortScience*, Mont Vernon, v.17, n.5, p.827-829, Oct. 1982.
- MOREIRA, M.A. Efeitos do Benomyl na multiplicação "in vitro" e da incubação em IBA no enraizamento do porta-enxerto Citrus sunk Hort ex. Tan. Lavras: ESAL, 1993. 62p. (Dissertação- Mestrado em fitotecnia).
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review Plant Physiology, Califórnia, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for growth and tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.L.M. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D. ed. Proceedings First International Citrus Symposium. Riverside, 1969. v.3, p.1155-1161.
- NAKAMURA, T.; SONDAHL, M.R. Micropropagação de cafeeiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 10, Poços de Caldas, 1983. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1983. p.116-117.
- NAKAMURA, T.; SONDAHL, M.R. Multiplicação "in vitro" de gemas ortotrópicas em *Coffea* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 9, São Lourenço, 1981. Anais... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1981. p.162-163.
- NEMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y.P.S, (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry I. Berlim: Springer-Verlag, 1986. p.65-85.
- PIERIK, R. L. M. ; MARANDI, D. In vitro culture of higher plants, Dorchecht, Martinus New Publishers, 1987, 344p.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 12.ed. Piracicaba, USP. 1987. 467p.
- PROEBSTING, W.M. Rooting of douglas-fir stem cuttings: relative activity of IBA and NAA. *HortScience*, Mont Vernon, v.19, n.6, p.854-856, Dec. 1984.

- PURUSHOTHAM, K.; VISHVESHWARA, S. Propagation coffee by cuttings: a preliminary report. *Indian Coffee*, Bangalore, v.44, n.4, p.55-56, Apr. 1980.
- RAMOS, J.D. Caracterização fenotípica do fruto, micropropagação e germinação de sementes do porta enxerto tangerina 'sunk' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) Lavras: ESAL, 1994. 85p. (Tese- Doutorado em Fitotecnia).
- REUVENI, O.; RAVIV, M. Importance of leaf retention to rooting of avocado cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.106, n.2, p.127-130, Feb.1981.
- SACHS, T.; THIMANN, K.V. The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany*, Columbus, v.54, n.1, p.136-144, Jan. 1967.
- SAN JUAN, R.C.C.; MATIELLI, A. Efeito do Triadinemol, dissulfoton e associação Triadinemol + dissulfoton em cafeeiro com resistência a ferrugem (3^o ano). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 21, Caxambu, 1995. Anais ... Rio de Janeiro: MAARA/PROCAFÉ, 1995. p.200.
- SAO JOSÉ, R.; LOPES, P.M.F.; SOUZA, I.V.B.; LIMA, E.M.; VILARES, A.S.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H. Efeitos de diferentes concentrações de IBA no enraizamento de estacas de urucueiros (*Bixa orellana* L.), tipo cultivado Bico de Pato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS, 1, Viçosa, 1992. Anais ... Viçosa: UFV, 1992.
- SKENE, K.G.M. Cytokinin-like properties of the systemic fungicide Benomyl. *Journal of Horticultural Science*, London, v.47, p.179-182, 1972.
- SLATYER, R.O. The effect of internal water status on plant growth development and yield. In: Plant response to climatic factors Proceedings of the Uppsala Symposium. Paris, UNESCO (1973), p.177-191. In: FIELD CROP Abstracts, London, v.27, n.7, p.374. July 1974. (Abst.3607)
- SNOECK, J. La renovation de la cafeiculture malgache a partir de clones selectionnes. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v.12, n.3, p.223-235. Jui.1968.
- SONDAHL, M.R.; LOH, W.H.T. Coffee Biotechnology. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffe*. London Agronomy, New York, 1987. v.4, p.235-264.

- SONDAHL, M.R.; LOH, W.H.T.; NAKAMURA, T. Propagação vegetativa "in vitro" de *Coffea* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 8., Campos do Jordão, 1980. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1980. p.129.
- SONDAHL, M.R.; 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. 325-347.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; 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.621-642.
- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO A. FAZOULI, L.C.; COSTA, W.R. Coffee. In: AMMYRATO, & McMILLEN, eds. **Handbook of plant cell culture.** New York: 1984. p.564-90
- SPURR, S.H.; BARNES, B.Y. **Forest ecology.** New York: The Ronald Press, 1973. 571p.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissue of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Netherlands, v.19, n.4, p.509-514, Aug. 1970.
- SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tests and antitranspirant on the acclimatization of tissue cultured plant to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, p.303-312, 1984.
- THOMPSON, M.R.; THORPE, T.A. Metabolic and non metabolic roles carbohydrates. In: BONGA, T.M.; DURZAN, D.J. (eds) **Cell and Tissue Cultures in Forestry.** Dordrecht:: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. p.35-37.
- THORPE, A.T.; PATEL, K.R. Clonal propagation: Adventitious Buds. In: VASIL, I.K., ed. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.** Orlando: Academic Press, 1984. p.49-60.
- TOLEDO, A.R.M. de. **Efeito de substratos na formação de laranja [*Citrus sinensis* (L)Osbeck cv. Pera Rio] em vaso.** Lavras: ESAL, 1992. 88p. (Dissertação de Mestrado em Fitotemia).
- VAN DE VOSSEN, H.A.M.; OP DE LAAK, J. Large scale rooting of soft wood cuttings of *Coffea arabica* in Kenya - I type of propagator, choice of rooting medium and type of cuttings. **Kenya Coffee**, Nairobi, v.41, n.488, p.385-399. 1976.
- WALKEY, D.G. Production of apple plantlets from axillary-bud meristems, **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.52, p.1085-1087, 1972.

- WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K.C. "in vitro" acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society For Horticultural Science*, v.108, n.2, p.386-389, Mar.1983.
- WENT, F.W. The experimental control of plant growth. New York: The Ronald Press. 1957, p. 164-168.
- YANG, H.J. Effect of Benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in culture media. *Hortscience*, Virginia, v.11, n.5, p.473-474, Oct.1976.
- ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars in vitro. *Journal of The American Society For Horticultural Science*. v.110, n.1, p.34-38, Jan., 1985.
- ZOK, S.; DUBLIN, P. Multiplication vegetative "in vitro" par culture d'apex chez *Coffea arabica* L.: action de solutions minérales et de regulaterus de croissance. *Cafe, Cacao, Thé*, Paris, v.35, n.4, p.245-256, Oct/Déc. 1991.