

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* L.¹

Julietta Andrea Silva de Almeida², Maria Bernadete Silvarolla³
Luiz Carlos Fazuoli⁴, Giulio Cesare Stancato⁵

(Recebido: 10 de abril de 2008; aceito: 17 de julho de 2008)

RESUMO: A espécie *Coffea arabica* L. possui genótipos com características de interesse, como o AC1, AC2 e AC3, cujas sementes apresentam conteúdo reduzido de cafeína. No entanto, cada um desses genótipos conta com uma única planta no Banco de Germoplasma do IAC, tendo, portanto, somente um acesso. Objetivou-se com este estudo avaliar a capacidade de embriogênese somática indireta dos genótipos AC e da cultivar Mundo Novo visando à sua multiplicação. Verificou-se que os três genótipos apresentaram capacidade embriogênica e formaram calos de tamanhos semelhantes entre si; no entanto, quanto à formação de embriões, o AC1 foi o mais eficiente.

Palavras-chave: Cafeeiro, calogênese, embriogênese somática indireta, *Coffea arabica*.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN GENOTYPES OF *Coffea arabica* L.

ABSTRACT: The species *Coffea arabica* possesses genotypes with special characteristics such as AC1, AC2 and AC3, whose seeds present reduced caffeine content. However, each of these genotypes has just a single plant in the Germplasm Bank, thus having only one access. The objective of the present study was to evaluate the somatic embryogenesis capacity of the AC genotypes with respect to their multiplication. It was shown that the three genotypes presented indirect somatic embryogenesis capacity, forming calluses of similar size. However, with respect to the formation of embryos, AC1 was the most efficient.

Key words: Coffee, callus, embryos, indirect somatic embryogenesis, *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é o processo pelo qual há a formação de uma estrutura bipolar, o embrião somático, que se desenvolve a partir de uma célula isolada ou de um pequeno grupo de células somáticas, não-zigóticas e sem conexão vascular com o tecido original (ARNOLD et al., 2002; CARMAN, 1990; DODEMAN et al., 1997; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Convencionalmente, a embriogênese somática é dividida em duas etapas principais: a primeira é a indução que leva algumas células dos explantes a adquirirem a característica embriogênica, ao passo que a segunda está associada à expressão do embrião somático (FEHÉR et al., 2003; JIMÉNEZ, 2005).

A embriogênese somática pode ocorrer por via direta (ESD), a partir de explantes de tecido

organizado, protoplastos isolados ou de micrósporos, ou via indireta (ESI) a partir de agregados de calos ou suspensão celular (EMONS, 1994). A via direta apresenta menor ocorrência, e a via indireta é descrita para a maioria das espécies. Entre 124 protocolos de indução de embriogênese somática em diferentes espécies, 30 % apresentaram ESD, 8 % ESD e ESI e o restante apenas ESI (GAJ, 2004).

Na ESD, embriões somáticos são formados a partir de células que já estão determinadas e competentes para o desenvolvimento embriogênico, antes da condição de explante, sem a ocorrência da fase de calo (GAJ, 2004; SHARP et al., 1982; WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Em *Coffea*, a ESD é obtida a partir de explantes que apresentam a formação de calo cicatricial em suas bordas (DUBLIN, 1981). Por outro lado, na ESI, primeiro, há a fase de re-determinação das células diferenciadas do explante, seguida da ativação da

¹Projeto financiado pela FINEP/CNPq.

²Pesquisador, Doutorado Fisiologia Vegetal/Centro de Café 'Alcides Carvalho' – IAC – Cx. P. 28 – 13001-970 – Campinas, SP – julietasa@iac.sp.gov.br

³Pesquisador, Mestrado Melhoramento Genético, Centro de Café 'Alcides Carvalho' – IAC – Cx. P. 28 – 13001-970 – Campinas, SP – bernadet@iac.sp.gov.br

⁴Pesquisador, Centro de Café 'Alcides Carvalho' – IAC – Cx. P. 28 – 13001-970 – Campinas, SP – fazuoli@iac.sp.gov.br

⁵Pesquisador, Dr., Fisiologia Vegetal, Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura – IAC – Cx. P. 28 – 13001-970 – Campinas, SP – stancato@iac.sp.gov.br

divisão e proliferação celular, que levam à formação do calo. Na segunda fase, ocorrem a iniciação e o desenvolvimento dos embriões a partir de determinadas células de alguns setores do calo. Essas duas fases da ESI estão fortemente associadas aos reguladores de crescimento vegetais (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986), especialmente auxinas e citocininas, que são fatores-chaves por participarem do ciclo celular (divisão celular) e da formação do citoesqueleto. Além desses, outros reguladores de crescimento apresentam envolvimento com a ocorrência da embriogênese somática, como as substâncias giberelínicas (TOKUJI & KURIYAMA, 2003), o ácido abscísico (NISHIWAKI et al., 2000), o etileno (KUMAR et al., 2007) e também a nova geração de substâncias reguladoras de crescimento, ácido jasmônico, poliaminas, brassinosteróides, ácido salicílico e oligossacarídeos (ARNOLD et al., 2002; JIMÉNEZ, 2005).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que possui efeito auxínico, é citado com maior frequência para a indução da embriogênese somática em diferentes espécies, sendo utilizado em concentrações altas e, dessa forma, leva as células dos explantes a uma condição de estresse que altera seu metabolismo e resulta na formação do calo (DUDITS et al., 1995). Em seguida à fase de indução do calo, a auxina deve ser removida do meio ou reduzida em sua concentração, já que sua presença, nessa fase, pode levar à diferenciação das células do calo, as quais se tornam alongadas e perdem a capacidade de formar embriões (NISSEN & MINOCHA, 1993; RAGHAVAN, 1997). Dessa forma, após a fase de indução da embriogênese somática, a auxina passaria a ter outro papel e o embrião também começa a sintetizar sua própria auxina (ZIMMERMAN, 1993). Por outro lado, em seguida à remoção ou redução da concentração da auxina, o desenvolvimento do embrião somático segue os processos de histodiferenciações semelhantes àqueles observados em embriões zigóticos, constando dos seguintes estádios morfológicos: globular, coração e torpedo (MENÉNDEZ-YUFFA & GARCIA, 1997).

A embriogênese somática tem sido aplicada com sucesso na maioria dos genótipos de *Coffea*, também com predominância da ESI (ALMEIDA et al., 2001; SILVA et al., 2005; SONDHAL et al., 1984; SONDAHL & SHARP, 1977); trata-se de eficiente

método de propagação que assegura a multiplicação rápida de elevado número de plantas. O Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) conta com três genótipos de *C. arabica* com grau próximo de parentesco entre si e reduzido teor de cafeína em suas sementes, denominados AC1, AC2 e AC3 (SILVAROLLA et al., 2004), cuja característica é de interesse para o programa de melhoramento do cafeeiro. No entanto, cada um desses genótipos é representado por um único acesso. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar a capacidade de embriogênese somática dos genótipos AC1, AC2, AC3 e da cultivar Mundo Novo, visando à sua multiplicação para aproveitamento no programa de melhoramento do cafeeiro (*Coffea arabica* L.).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se folhas coletadas até do terceiro par do ramo plagiotrópico de plantas dos genótipos AC1, AC2 e AC3 e da cultivar Mundo Novo IAC 376-4 (MN) de *C. arabica*, mantidas em casa-de-vegetação, no IAC. As folhas foram desinfestadas, inicialmente, em solução de detergente e, em seguida, submetidas à solução de hipoclorito de sódio (2%) por vinte e cinco minutos e enxaguadas em água destilada por três vezes. Posteriormente, essas folhas foram mantidas em câmara úmida (80% de umidade) por vinte e quatro horas, e, após esse período, submetidas novamente à solução de hipoclorito de sódio (2%), conforme descrito acima. A partir dessas folhas, em câmara de fluxo laminar, obtiveram-se explantes retangulares (2 cm²). Em uma das bordas de cada um desses explantes, fizeram-se cortes paralelos a partir do meio para a sua borda. Com esses cortes objetivou-se favorecer maior contato entre o meio de cultura e a superfície do explante, o que pode causar maior disponibilidade de nutrientes e substâncias de crescimento para maior número de células das bordas dos explantes.

Cada explante foi inoculado individualmente em frasco de vidro transparente (210 mL) contendo 30 mL de meio de indução de calo composto por sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescidos de 2,5 µM de 2,4-D e 5 µM de cinetina, de acordo com Sondhal & Sharp (1977) e modificado por Ramos et al. (1993). Os calos formados a partir desses explantes foram transferidos para 30 mL de meio de indução de embriogênese, que consistiu de metade

dos sais de MS, com adição de 0,5 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e 2,5 μM de cinetina.

Realizaram-se dois experimentos: no primeiro os explantes foram obtidos de folhas coletadas na época da primavera, no mês de outubro. Esses explantes foram inoculados em meio de indução de calo, mantidos na presença e ou ausência de luz e avaliados após 90 dias de sua inoculação. No segundo experimento, as folhas foram coletadas no verão, no mês de fevereiro, e os explantes obtidos inoculados em meio de indução de calo, sendo mantidos por 120 dias. Os calos formados a partir desses explantes foram fragmentados e transferidos para meio de indução de embriogênese. Nesse segundo experimento, os tratamentos foram avaliados ao longo da calogênese e também da fase de embriogênese.

Os tratamentos foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros: número de lados do explante com formação de calo cujo valor numérico, obtido por notas visuais, variou entre 0 a 4, estimativa do tamanho do calo e número de embriões formados. O tamanho dos calos foi obtido por meio do uso de uma régua milimetrada, a qual foi posicionada junto ao frasco na região onde estava o calo e estimado o seu

tamanho. Para o número de embriões, considerou-se o número total de embriões formados pelo número total de fragmentos de calos inoculados no meio de indução de embriogênese.

Neste estudo, o primeiro experimento constou de oito repetições, sendo um frasco com um explante. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado e os dados obtidos foram analisados estatisticamente (GOMEZ & GOMEZ, 1984) usando o teste F e as médias sendo comparadas pelo Teste Tukey, ambos ao nível de 5%. Para o segundo experimento, cada tratamento também constou de oito repetições, sendo um frasco com um explante, e os dados foram analisados pelo teste F ao nível de 5%, e as médias resultantes submetidas à análise de regressão de acordo com Gomez & Gomez (1984).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que todos os genótipos AC e o Mundo Novo apresentaram capacidade de embriogênese somática indireta, formaram calos (Figuras 1A e 1B) e, posteriormente, embriões (Figura 1C), os quais alcançaram o estágio de plântula (Figura 1D).

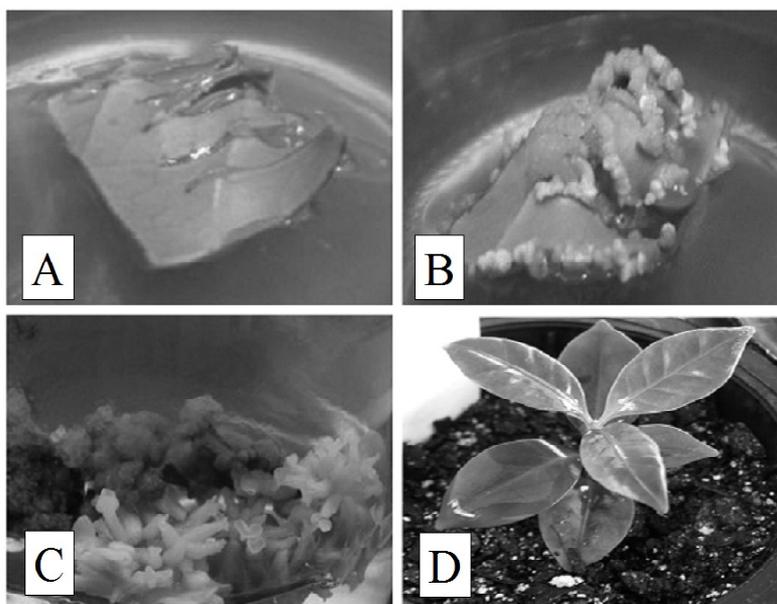


Figura 1 – Embriogênese somática indireta a partir de explantes foliares do genótipo AC1 de *C. arabica*. A. Explante foliar apresentando a formação de calo em meio de indução de calo. B. Calos em desenvolvimento nas bordas do explante foliar. C. Calo com formação de embriões. D. Plântula desenvolvida a partir de embrião somático, em condição de viveiro.

A luz é um dos mais importantes sinais do ambiente que pode influenciar as respostas morfológicas das plantas. No entanto, embora haja estudos relativos ao efeito da luz nas respostas dos tecidos *in vitro*, esse aspecto ainda é limitado. Prakash & Gurumurthi (2005) verificaram que explantes de *Eucalyptus tereticornis* Sm. apresentaram maior formação de embriões quando cultivados em presença de luz do que na sua ausência. Entretanto, neste estudo, quando explantes de todos os genótipos foram mantidos na presença e/ou ausência de luz por 90 dias, verificou-se que a maioria desses explantes apresentou elevada taxa da iniciação da formação de calos tanto na luz quanto no escuro (dados não apresentados). Porém, na luz, o desenvolvimento desses calos foi comprometido, permanecendo com tamanho significativamente menor que aqueles mantidos no escuro (Figura 2). Os calos, na presença de luz, tornaram-se completamente oxidados, e aqueles mantidos no escuro atingiram a coloração castanho-clara (dados não apresentados).

Verificou-se, com base nas observações relativas ao efeito da iluminação, que na presença de luz os explantes dos genótipos AC e Mundo Novo apresentaram a indução e a iniciação da formação de calos, porém a luz impediu o seu posterior desenvolvimento. Essas respostas dos explantes dos

genótipos AC e Mundo Novo também são semelhantes à verificada para a maioria dos genótipos de *Coffea*, cuja calogênese, normalmente, não ocorre na presença de luz (ALMEIDA et al., 2001; MACIEL et al., 2003; SANTANA et al., 2004). Por outro lado, de acordo com Santana-Buzzy et al. (2007), em geral, no início do cultivo *in vitro*, em diferentes tipos de explantes, verificou-se intensa divisão celular, principalmente nas células próximas do corte, levando à geração dos calos. Neste estudo, também se verificou intensa iniciação da formação de calos a partir dos explantes dos genótipos AC e MN, logo após a sua inoculação. Nota-se, ainda, que uma das bordas de cada explante deste estudo foi previamente seccionada em cortes paralelos, o que causou a formação de uma “franja”. Na região de cada corte da “franja”, houve a formação de calo, inferindo-se que os cortes podem favorecer a maior ocorrência dele, possivelmente devido ao aumento da superfície de contato entre o meio de cultura e as células das bordas dos explantes.

No segundo experimento, avaliou-se a capacidade de embriogênese somática, a partir dos explantes dos genótipos AC e Mundo Novo mantidos no escuro, ao longo das fases de calogênese e embriogênese (Figura 3).

Para a fase de calogênese, verificou-se que 100% dos explantes de todos os genótipos

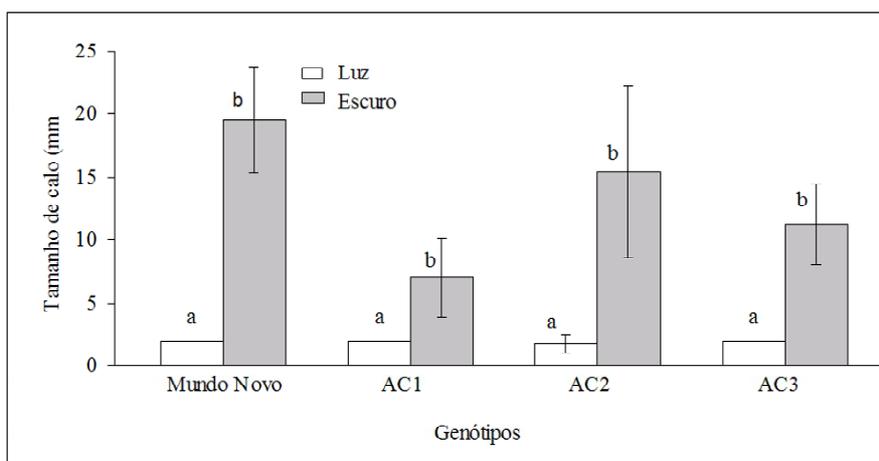
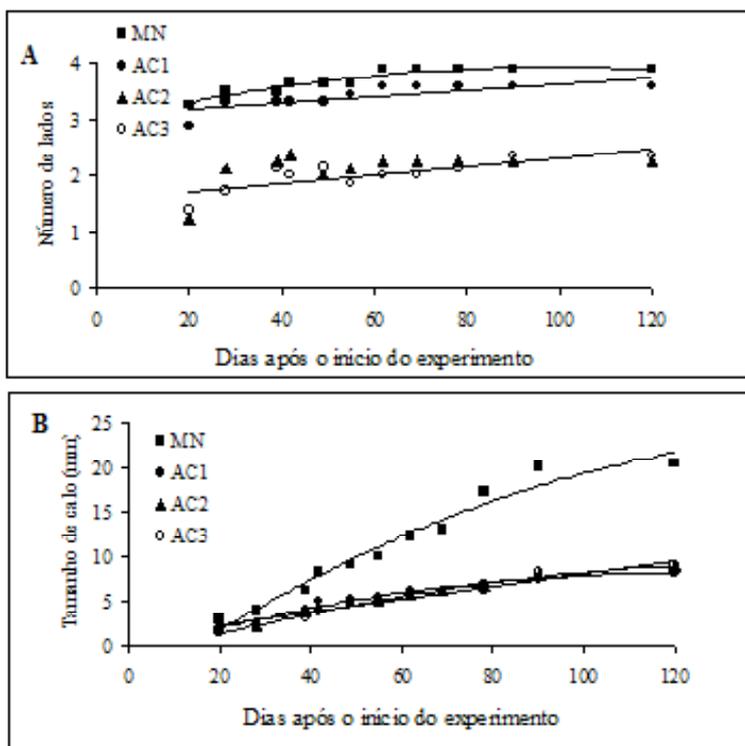


Figura 2 – Efeito da presença e ausência de luz na estimativa do tamanho (mm) dos calos formados a partir de explantes foliares de quatro genótipos de *Coffea arabica* aos 90 dias após a sua inoculação no meio de indução de calo. Na região de cada genótipo, barras seguidas das mesmas letras indicam que não houve diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.



Parâmetro avaliado	Equação	R ²
Número de lados do explante com formação de calo	$Y_{MN} = -0,0001x^2 + 0,0201x + 2,9266$	0,9162
	$Y_{AC1} = 0,006x + 3,0361$	0,6380
	$Y_{AC2} = NS$	
	$Y_{AC3} = 0,0075x + 1,562$	0,6040
Tamanho de calo	$Y_{MN} = -0,0011x^2 + 0,3468x - 4,7546$	0,9630
	$Y_{AC1} = 0,1364x^2 + 5,7485x + 16,333$	0,9915
	$Y_{AC2} = 0,0719x + 1,0425$	0,9500
	$Y_{AC3} = -0,0005x^2 + 0,1412x - 1,2763$	0,9825

*Equações significativas pelo teste F a 5 %.

Figura 3 – Capacidade de embriogênese somática indireta em explantes foliares dos genótipos AC1, AC2 e AC3 de *Coffea arabica*, mantidos em ausência de luz e a 25°C. **A.** Número de lados do explante com formação de calo; **B.** Determinação do tamanho de calo (mm).

apresentaram a formação de calos (dados não apresentados). Por outro lado, o número de lados dos explantes retangulares com formação de calos foi, em média, de três para os genótipos MN e AC1 e dois lados para o AC2 e AC3 (Figura 3A). O maior número de lados do explante com formação de calo indicou que os genótipos MN e AC1 apresentaram maior eficiência de formação de calo que AC2 e AC3.

Conforme discutido, anteriormente, a presença da “franja” nos explantes pode ter favorecido um maior contato entre o explante e o meio de cultura, resultando em maior formação de calo. No entanto, observa-se que, embora todos os explantes desses genótipos tenham tido a “franja”, que promoveu aumento da superfície de contato entre o explante e o meio, ainda assim foi possível caracterizar a diferença entre os

genótipos quanto à eficiência da formação de calos. A estimativa indireta do tamanho dos calos revelou que os calos oriundos dos explantes do genótipo MN foram maiores que os formados pelos três AC (Figura 3B). Por outro lado, entre os genótipos AC, não houve diferença quanto ao tamanho dos seus calos. Verificou-se também que esses calos mantiveram-se claros até 62 e 80 dias, respectivamente, para os genótipos AC e MN e, em seguida, tornaram-se castanho-claros (dados não apresentados). Na embriogênese somática de *Coffea*, verifica-se que, em geral, a formação de embriões ocorre após o início da oxidação dos calos. A coloração escura em calos de *Coffea* está associada ao metabolismo de fenóis, que é característico dessa espécie, e que se encontra em concentração elevada (MONACO et al., 1977).

Determinou-se o número total de embriões formados a partir de sete fragmentos de calos de cada um dos genótipos estudados, após 120 dias da sua transferência do meio de indução de calo para o de indução de embriogênese. No entanto, a resposta foi diferenciada entre os genótipos AC, tendo o AC1 formado 112 embriões por sete fragmentos de calos; portanto, esse foi mais eficiente que AC2 e AC3, que formaram número inferior, 46 e 45, respectivamente (Figura 4). Por outro lado, verifica-se ainda nesta figura que os genótipos AC formaram maior número de embriões que o Mundo Novo, que produziu apenas seis. Fatores endógenos e do ambiente podem estar associados às respostas diferenciadas entre os genótipos AC, uma vez que podem influenciar o controle da divisão, alongação, polaridade e diferenciação celular (DODEMAN et al., 1997).

Corroborando com tal informação, em oito genótipos de *Coffea arabica*, foi relatada a influência de fatores ambientais e as condições fisiológicas da planta doadora de explantes no controle da formação dos embriões somáticos (ALMEIDA et al., 2005). Adicionalmente, diferentes fatores podem ser determinantes na transição das células somáticas para embriogênicas, como o estágio de desenvolvimento do tecido doador dos explantes (CONGER et al., 1983); a posição da folha doadora de explante em relação à planta-mãe e a posição do explante em relação ao tecido doador de explante (SHARMA & RAJAM, 1995).

Além do efeito genotípico, em que há genótipos que respondem enquanto outros são pouco responsivos ou recalcitrantes à embriogênese somática (MOLINA et al., 2002). Por outro lado, Jong et al. (1993) consideram também que a ausência ou baixa capacidade de embriogênese somática pode ser associada a diferenças na habilidade de as células somáticas tornarem-se embriogênicas ou, ainda, devido à frequência da ocorrência de um tipo celular particular responsivo nesses tecidos.

Considerou-se, ainda em detalhe, a formação dos embriões, levando-se em conta os valores absolutos dos tamanhos dos fragmentos dos calos e o número de embriões formados respectivamente, a partir de cada um deles (Tabela 1). Nota-se que, em geral, os fragmentos dos calos formaram números diferentes de embriões e também que esse número não dependeu do seu tamanho. Observa-se na Tabela 1, por exemplo, que um fragmento de calo com 25 mm formou cinco embriões, enquanto outro com 10

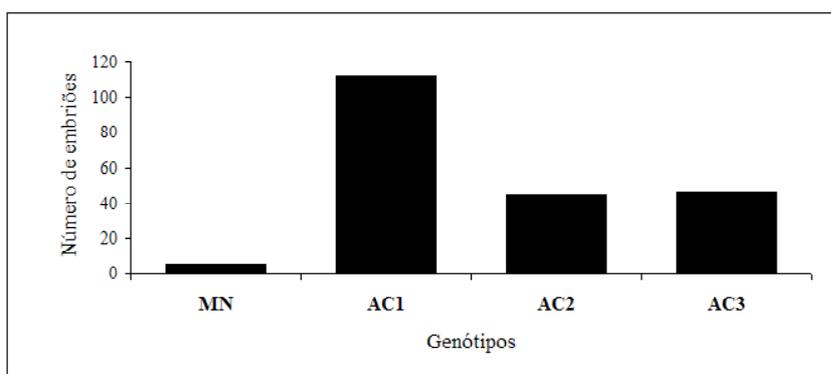


Figura 4 – Número total de embriões formados a partir de sete fragmentos de calos de quatro genótipos de *Coffea arabica* após a sua manutenção por 120 dias em meio de indução de embriogênese.

Tabela 1 – Caracterização do tamanho dos fragmentos de calos (TFC) dos diferentes genótipos de *C. arabica* e do número de embriões (NE) formados a partir de cada um desses, após 120 dias no meio de indução de embrionese.

MN		AC1		AC2		AC3	
TFC*	NE	TFC	NE	TFC	NE	TFC	NE
15	0	5	50	15	15	6	0
25	5	10	60	18	0	10	15
17	0	4	1	4	1	10	18
24	0	10	1	5	9	6	1
22	0	8	0	15	0	10	0
15	0	12	0	5	20	7	0
27	1	8	0	5	0	12	12

*TFC: Tamanho de fragmento de calo em mm.

mm produziu 60 embriões. Segundo Sondhal & Sharp (1977) células da camada superficial dos calos passam para a etapa de diferenciação, mas somente algumas são responsivas à formação dos embriões, pois a diferenciação celular se deve à competência, determinação e ativação celular (ERMAKOV & MATVEEVA, 1994). Jong et al. (1993) também verificaram que no sistema de cultura de células embrionicas de cenoura somente 1% a 2% das células originaram embriões somáticos com sucesso; as demais não foram capazes de formar embriões. Possivelmente, as diferentes respostas de capacidade de embrionese dos genótipos AC também possam ser associadas à existência dessa baixa porcentagem de ocorrência de células que, eventualmente, diferenciam-se em embriões, embora fosse esperado que os genótipos estudados pudessem apresentar respostas semelhantes, já que são bastante aparentados. Apesar das diferenças entre os genótipos estudados, quanto ao número de embriões formados, obtiveram-se plântulas regeneradas, sendo esse fato importante, uma vez que esses materiais são promissores para o desenvolvimento de novas cultivares. Destaca-se ainda que o genótipo AC1 superou inclusive a cv Mundo Novo, que foi usada como controle e que se trata de material cultivado.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que entre os genótipos estudados, o AC1 foi mais eficiente quanto à capacidade de embrionese somática que AC2 e AC3, portanto, sendo o mais adequado para futuras aplicações em estudos de melhoramento do cafeeiro e de transformações.

4 AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo subsídio a realização deste trabalho.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. A. S.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. S. Efeito das estações do ano na calogênese e embrionese somática em oito genótipos de *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Resumos Expandidos...** Brasília, DF: Embrapa Café; Minasplan, 2005. p. 1-5.
- ALMEIDA, J. A. S.; SIMIONI, K. C. M.; FAZUOLI, L. C.; RAMOS, L. C. S. Obtenção de embriões a partir de calos de genótipos de *Coffea*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos Expandidos...** Brasília, DF: Embrapa Café; Minasplan, 2001. v. 1, p. 34-35.
- ARNOLD, S. von; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 233-249, 2002.
- CARMAN, J. G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. **In Vitro Cell Development Biology**, New York, v. 26, p. 746-753, 1990.
- CONGER, B. V.; HANNING, G. E.; GRAY, D. J.; MCDANIEL, J. K. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. **Science**, New York, v. 221, p. 850-851, 1983.

- DODEMAM, V. L.; DUCREX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1493-1509, 1997.
- DUBLIN, P. Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café Cacao Thé**, v. 25, n. 4, p. 237-241, 1981.
- DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. cap. 8, p. 267-308.
- EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 43, p. 1-14, 1994.
- ERMAKOV, L. P.; MATVEEVA, N. P. Regulation of early embryogenesis in higher plants. **Russian Journal Plant Physiology**, Moscow, v. 41, p. 414-423, 1994.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, p. 201-228, 2003.
- GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 43, p. 27-47, 2004.
- GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. A. **Statistical procedures for agricultural research**. New York: J. Wiley & Sons, 1984. 654 p.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, p. 91-110, 2005.
- JONG, A. J. de; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. de. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v. 22, p. 367-377, 1993.
- KUMAR, V.; RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of different ethylene inhibitor on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora*. **In Vitro Cellular & Development Biology Plant**, Berlin, v. 43, n. 6, p. 602-607, 2007.
- MACIEL, A. L. R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 107-116, 2003.
- MENÉNDEZ-YUFFI, A.; GARCIA, E. G. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". **Protoplasma**, Vienna, v. 199, p. 208-214, 1997.
- MOLINA, D. M.; APONTE, M. E.; CORTINA, H.; MORENO, G. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, p. 117-123, 2002.
- MONACO, L. C.; SONDHAL, M. R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O. J.; SHARP, W. Applications of tissue culture in the improvement of Coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. cap. 6, p. 109-248.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 756-759, 2000.
- NISSEN, P.; MINOCHA, S. C. Inhibition by 2,4D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by difluoromethylornithine. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 89, p. 673-680, 1993.
- PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 8, p. 1311-1316, 2005.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 285-301, 2006.

- RAGHAVAN, V. **Molecular embryology of flowering plants**. Cambridge: Cambridge University, 1997. 712 p.
- RAMOS, L. C. S.; YOKOO, E. Y.; GONÇALVES, W. Direct embryogenesis is genotype specific in coffee. In: COLLOQUIUM OF INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION, 15., 1993, Montpellier, France. **Proceedings**... Montpellier: ASIC, 1993. p. 763-766.
- SANTANA-BUZZY, N.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; KU-CAUICH, J. R.; MIJANGOS-CORTÉS, J.; GUTTIÉRREZ-PACHECO, L. C.; CANTO, A.; QUIROZ-FIGUEROA, F.; LOYOLA-VARGAS, V. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, New York, v. 43, p. 507-520, 2007.
- SANTANA, N.; GONZÁLEZ, M. E.; VALCÁRCEL, M.; CANTO-FLICK, A.; HERNÁNDEZ, M. M.; FUENTES-CERDA, C. F. J.; BARAHONA, F.; MIJANGOS-CORTÉS, J.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta Coffee (*Coffea canephora*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Rockville, v. 40, p. 95-101, 2004.
- SHARMA, P.; RAJAM, M. V. Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal Experimental Botany**, London, v. 46, p. 135-141, 1995.
- SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; SONDHAL, M. R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5., 1982, Tokio. **Proceedings**... Tokio: Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982. p. 759-762.
- SILVA, R. F. da; HERMOSO-GALLARDO, L.; MENÉDEZ-YUFFA, A. Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv Catimor. **Interciencia**, Caracas, v. 30, p. 694-698, 2005.
- SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, London, v. 429, p. 826, 2004.
- SONDHAL, M. R.; NAKAMURA, T.; MEDINA-FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. Coffee. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1984. p. 563-590.
- SÖNDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 81, p. 395-408, 1977.
- TOKUJI, Y.; KURIYAMA, K. Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 133-141, 2003.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 443-462, 1986.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.