III Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira
III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry

24 - 28 de maio May 24 - 28, 1999
Londrina - PR - Brasil

Anais/Proceedings

UFPR

IAPAR

IRD

R551a RIEDE, C.R. coord.
Anais do 3. seminário internacional sobre biotecnologia na agroindústria cafeeira/ coord. por Carlos Roberto Riede e outros
Londrina: IAPAR/IRD, 2000.
513p.

1.Café-Congressos. 2.Agroindústria. 3.Biotecnologia. I.Sera, Tumoru, coord. II.Soccol, Carlos Ricardo, coord. III.Roussos, Sevastianos, coord. IV.Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR. V.Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. VI.Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, França. VII.Título.

CDD 633.73
AGRIS F01
E21
2120

ANAIS DO III SIBAC

Coordenadores: Carlos Roberto Riede

Tumoru Sera

Carlos Ricardo Soccol

Sevastianos Roussos

Digitação e adequação de textos: Marcos Zorzenon Alteia

Emerson Tadashi Nakamura

Editores: Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR

Institut de Recherche pour le Développement – IRD

A responsabilidade da comissão editorial limita-se a adequação dos trabalhos as normas editoriais estabelecidas.

A ortografia, a correção gramatical e o conteúdo dos trabalhos aqui publicados são de responsabilidade dos autores.

24 – 28 de Maio, Londrina – PR – Brasil.

Comissão organizadora

- Carlos R. Soccol (UNIV. FED. DO PARANÁ – Brasil)
- Sevastianos Roussos (IRD –França)
- Tumoru Sera (IAPAR – Brasil)

- **COMISSÃO EXECUTIVA:**
- COORDENADOR: Tumoru Sera
- SUB-COMISSÃO DE PROGRAMAÇÃO TECNICO-CIENTIFICA: Carlos R. Soccol; Carlos R. Riede; Luiz F. Pereira; Luiz G. E. Vieira; Sevastianos Roussos; Tumoru Sera.
- SUB-COMISSÃO DE CAPTAÇÃO DE RECURSOS: Armando Androcioli F°.; Francisco B. Lima; Luiz R. Ferrari; Samir Cury.
- SUB-COMISSÃO DE MARKETING: Marcos V. F. Martins; Michele Peres.
- SUB-COMISSÃO DE IMPRENSA: Oswaldo Petrin.
- SUB-COMISSÃO DE POSTERS: Maria C. L. L. Dias; Maria L. Crochemore.
- SUB-COMISSÃO DE RELAÇÕES PÚBLICAS: Luiz. F. Kalinowsky.
- SUB-COMISSÃO DE INFORMÁTICA: Welfrid Stenzel
- SUB-COMISSÃO SERVIÇOS GRÁFICOS: Tadeu Sakiyama.
- SUB-COMISSÃO DE INFRAESTRUTURA: Júlio C. D. Chaves; João da Mata Siqueira; Claudomir A. da Silva.
- SUB-COMISSÃO DE CONTACTOS INSTITUCIONAIS: Florindo Dalberto; Marcos Krieger; Rogério M. L. Cardoso.
- SUB-COMISSÃO DE FINANÇAS: José Pereira da Silva; Júlio César Chaves.
- SUB-COMISSÃO DE "DIA DE CAMPO": Armando Androcioli F°.; José A. Azevedo; Marcos. Pavan; Paulo H. Caramori; Rodolfo M. de Carvalho

COMISSÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA:

Alemar B. Rena (CBP&D CAFÉ/Brasil), Alex Bustillo-Pardey (CENICAFE / Colômbia), Antônio P. Nacif (CBP&DCAFÉ/Brasil), Ashok Pandey (CEFRI/Índia), Christopher Augur (IRD / México), Daniel Martinez-Carrera (COL.POST / México), Gerardo Saucedo-Castañeda (UAM / México), German Moreno-Ruiz (CENICAFE / Colômbia), Gustavo Viniegra-González (UAM / México), Isabelle Gaime-Perraud (IRD / México), Ivone Ferrao (DG12/UNIÃO EUROPÉIA), Jaime Zuluaga-Vasco (CENICAFE / Colômbia), Joseph Le Bars (INRA / França), Marc Berthouly (CIRAD / França), Moacyr Paschoal (UFLA / Brasil), Maurice Lourd (IRD / Brasil), Ney Sakiyama (UFV / Brasil), Oliveiro Guerreiro (IAC / Brasil), Philippe Lashermes (IRD / França).

SECRETARIA EXECUTIVA:

- Secretaria: Emerson Tadashi Nakamura; Françoise Simoni; Marcos Z. Altéia; Rubens Sacchetto
  Fone: (043) 376.2294 Fax: (043) 376.2101 E-mail: sibac@pr.gov.br

SUMÁRIO

SessãoInicial – Palestra

Pág.

BIOTECHNOLOGY AND THE FUTURE OF COFFEE PRODUCTION.
Gustavo Viniegra González 1

Sessão 1 – CLONAGEM E CULTURA DE TECIDOS

A – Palestras

BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFETO.
Marc Berthouly 9

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE.
Marc Berthouly and Hervé Etienne 23

DESENVOLVIMENTO DE CAFEEIROS GENETICAMENTE MODIFICADOS COM VISTAS À UNIFORMIDADE DE MATURAÇÃO DOS FRUTOS.
Luís Felipe Pereira, Luís Gonzaga Vieira e Adilson Kenji Kobayashi 37

PROGRAMA BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA AO CAFEEIRO.
Alemar Braga Rena e Antonio de Pádua Nacif 43

APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFÉ EN COLOMBIA.
Germán Moreno, Myriam de Peña,Ricardo Acuña, María Eugenia Aponte, Juan Carlos Herrera, Diana Molina, Alvaro Gaitán, Marco Cristancho, Pilar Moncada,Carmenza Góngora y Gabriel Cadena 47

AVANÇOS NA OBTENÇÃO DE DI-HAPLOIDES EM CULTIVARES DE *Coffee arabica L.*
Maria Filomena Carneiro 55

CUSTO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CLONAGEM.
Maro R. Sondahl, Clemencia N. Sondahl e Wallace Gonçalves 59

COFFEE (*Coffea SP.*) GENETIC TRANSFORMATION FOR INSECT RESISTANCE.
Magali Dufour, Thierry Leroy, Cathy Carosco-Lacombe, René Philippe and Catherine Fenouillet..... 507

B – Posters

EFECTO DEL GENOTIPO Y ÉPOCA DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA DE *Coffea arabica* VAR. CATURRA X HÍBRIDO DE TIMOR.
Molina V., D M.; Aponte A., M E.; Cortina G., H. y Moreno R., L G. 69

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DO BOTÃO FLORAL PARA A CULTURA DE ANTERAS NO CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.).
Luciana Marques da Cunha Andrade,André Barretto Pereira, Edilene Carvalho Santos e Moacir Pasqual 75

INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA CULTURA DE EMBRIÕES"IN VITRO" DO CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO LCH 2077-2-5-44.
Luciana Marques da Cunha Andrade, André Barretto Pereira, Ronilda Juliana de Campos e Moacir Pasqual 79

INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO "IN VITRO" DA CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO LCH 20 77-2-5-44.
Luciana Marques da Cunha Andrade, André Barretto Pereira, Anna Lygia de Rezende Maciel e Moacir Pasqual 83

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y AGRONÓMICA DE PLANTAS DE CAFÉ REGENERADAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.
Juan Carlos Herrera – Pinilla y Maria Eugenia Aponte –A. 87

A MODEL FOR THE STUDY OF VARIATION INDUCED BY TISSUE CULTURE ON COFFEE.
Fuentes-Cerda, C. F. J., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas-Herrera, J. Mijangos-Cortés and V. M. Loyola-Vargas 93

STANDARDIZATION OF ENCAPSULATION TECHNIQUE FOR PRODUCING SYNTHETIC SEEDS IN COFFEE.
B. Muniswamy and H L. Sreenath 99

DESARROLLO DE LA VARIEDAD PORTA-INJERTOS "NEMAYA" (*C. canephora*) PORMEDIO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CENTRO AMERICA.
F. Anzueto, A. Molina , P. Figueroa , H. Etienne y B. Bertrand 103

FUSÃO INTERESPECÍFICA DE PROTOPLASTOS EM *Coffea.*
Cordeiro, AT; Zambolim, L; Pétiard, V e Spiral, J. 109

Sessão 2 – MARCADORES MOLECULARES

A – Palestras

MARCADORES DE DNA PARA MELHORAMENTO DO CAFEEIRO.
Ney Sussumo Sakiyama 115

GENETIC DIVERSITY AND MOLECULAR MAPPING OF COFFEE.
Lashermes P., Combes M.C., Topart P., Anthony F. 121

MICROSATELLITES IN *Coffea arabica* CONSTRUCTION AND SELECTION OF TWO GENOMIC LIBRARIES.
Vascotto F., Ivanissevich S., Rovelli P., Anthony F. , Anzueto F., Lashermes P., Graziosi 125

OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM *Colletotrichum s.p,*ISOLADOS DE CAFEEIRO(*Coffea arabica*).
Margarida P. Rocheta, T. Bessa, A. Dias, A. Várzea, V. Rodrigues Jr. e C.J.Tenreiro, R. 129

GENETIC FINGERPRINTING OF COFFEE LEAF RUST DIFFERENTIALS WITH RAPD MARKERS.
A.Santa Ram and H.L.Sreenath 133

B – Posters

PADRÃO MOLECULAR DE CLONES DE CAFEEIRO DIFERENCIADORES DE *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.
Terezinha A. Teixeira, Laércio Zambolim, Ney S. Sakiyama, Antônio A. Pereira e Dalza G. da Silva 141

GENETIC DIVERSITY OF CENICAFE COFFEE GERMPLASM COLLECTION.
Marco Cristancho, Hernando Cortina and German Moreno 145

GENETIC ANALYSIS OF BRAZILIAN STRAINS OF *Xylella fastidiosa* ASSOCIATED WITH CITRUS AND COFFEE.
Rui P. Leite Jr., Angela Mehta, Flávia M. S. Carvalho and Bernardo Ueno 151

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDIES OF THE MAIN PROTEIN IN THE COFFEE ENDOSPERM.
Ricardo Acuña, Ronald Bassüner, Vadim Beilinson, Hernando Cortina, Gabriel Cadena-Gómez, Virginia Montes and Niels Nielsen 155

USO DE PADRÕES ELETROFORÉTICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE CULTIVARES E DO NÍVEL DE DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE *Coffea arabica.*
L. Brandão Jr., Delacyr da Silva; Vieira, Maria das Graças Guimarães Carvalho; Bernadino Filho, José Roberto; Hilhorst, Henk e Guimarães, Rubens José 161

VARIABILIDADE GENÉTICA OBTIDA POR RAPD EM ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE *Coffea.*
Paulo M. Ruas, Leandro E. C. Diniz, Claudete F. Ruas e Tumoru Sera 165

POLIMORFISMO GENÉTICO DETECTADO EM 40 VARIEDADES E CULTIVARES DE *Coffea arabica* UTILIZANDO RAPD ASSOCIADO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.
Leandro E.C. Diniz, Paulo M. Ruas, Claudete F. Ruas e Tumoru Sera 171

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE *Coffea* POR MARCADORES RAPD.
Terezinha A. Teixeira, Ney S. Sakiyama, Laércio Zambolim, Antônio A. Pereira e Cássia C. H. Sakiyama 177

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CAFÉ.
José W. Bustamante P. y Delia Polanco L. 181

MAPEAMENTO DE GENE DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM-DO-CAFEEIRO (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) COM MARCADOR RAPD.
Nara S. Tedesco, Ney S. Sakiyama, Laércio Zambolim, Terezinha A. Teixeira,Antônio A. Pereira e Cássia C. H. Sakiyama 185

Sessão 3 – MELHORAMENTO GENÉTICO

A – Palestras

BIOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES NUM MENOR PRAZO NO "MODELO IAPAR DE CAFÉ ADENSADO".
Tumoru Sera 191

DESENVOLVIMENTO DE CAFEEIROS RESISTENTES A INSETOS.
Oliveiro Guerreiro Filho 205

CENETIC IMPROVEMENT OF COFFEE IN INDIA.
C. S. Srinivasan, N. S. Prakash, D. Padma Jyothi, V.B. Sureshkumar and V. Subbalakshmi 211

MELHORAMENTO CLÁSSICO DO CAFEEIRO RELACIONADO COM A BIOTECNOLOGIA MODERNA.
L. C. Fazuoli , M. P. Maluf , O. Guerreiro Filho, H. P. Medina Filho e M. B. Silvarolla 217

EL MEJORAMIENTO GENÉTICO EN AMÉRICA CENTRAL.
Bertrand B., Etienne H., Santacreo R., Anzueto F. y Anthony F. 231

B – Posters

BIOTECHNOLOGY FOR GENETIC IMPROVEMENT OF INDIAN COFFEE.
H.L. Sreenath 247

CUSTO DE PRODUÇÃO MANUAL DE SEMENTES HÍBRIDAS DE CAFÉ.
Sergio Fadelli e Tumoru Sera 251

ESTUDO DA CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DA HETEROSE EM CRUZAMENTOS ENTRE LINHAGENS DE CATUAÍ E HÍBRIDO DE TIMOR, EM CAFÉ.
José Roberto M. Fontes, Antônio A. Cardoso, Cosme Damião Cruz Laércio Zambolim, Ney S. Sakiyama e Antônio A. Pereira 255

RESISTÊNCIA DE CLONES DE *C. canephora* VAR. CONILLON A *Hemileia vastatrix* BERK. & BR.
Dalza G. da Silva, Laércio Zambolim, Ney S. Sakiyama, Antônio A. Pereira, Aymbiré F. A. Fonseca, Terezinha A. Teixeira e Cássia C. H. Sakiyama 261

Sessão 4 – CONTROLE BIOLÓGICO

A – Palestras

EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFÉ, *Hypothenemus hampei*, EN COLOMBIA.
Alex E. Bustillo P. 265

CONTROL BIOLOGICO DE PLAGAS DEL CAFETO: PRODUCCION Y SECADO DE BIOPESTIDIDAS EN FERMENTACION EM MEDIO SOLIDO.
S. Roussos, C. Bagnis, W. Rodrigues, M. A. Aquihuatl, O. Besnard y R. Duponnois 269

THE NEMATOPHAGOUS FUNGI HELPER BACTERIA (NHB): A NEW DIMENSION FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF ROOT KNOT NEMATODES BY TRAPPING FUNGI.
Robin Duponnois, J.L.Chotte, A.M.Bâ and S. Roussos 275

LOS INHIBIDORES DE AMILASAS COMO ALTERNATIVA EN LA PRODUCCION DE CAFE RESISTENTE A LA BROCA.
Arnubio Valencia Jiménez, María T. González y Alex E. Bustillo P. 283

B – Posters

ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PRODUÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZEOS.
Álvaro Alberto de Araújo e Sevastianos Roussos 293

CHARACTERISATION OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* ISOLATES FOR POTENTIAL USE AGAINST THE COFFEE BERRY BORER.
Patricia E. Vélez, María T. González, Armando Rivera, Alex E. Bustillo P., María N. Estrada and Esther C. Montoya 299

PRIMEIRA INTRODUÇÃO NO BRASIL DO ENDOPARASITÓIDE *Phymastichus coffea* (LASALLE) (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE), PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA BROCA-DO-CAFÉ *Hypothenemus hampei* (FERRARI) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE).
Fernando Cantor, Evaldo F. Vilela e Alex E. Bustillo P. 305

EXTRACCION Y EVALUACION DE AMILASAS DIGESTIVAS DE LA BROCA DEL CAFÉ. *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE).
Claudia P. Martínez Díaz, Arnubio Valencia Jiménez, María T. González G., Alex E. Bustillo P..... 307

ATRATIVIDADE DE FRUTOS À BROCA-DO-CAFÉ, *Hypothenemus hampei*(FERRARI): ESTÍMULOS VISUAIS E OLFATIVOS.
Jorge Rafael Mendoza), José Oscar Gomes de Lima, Evaldo Ferreira Vilela e César José Fanton 313

AVANÇOS NAS TÉCNICAS PARA CRIAÇÃO MASSAL DO PARASITÓIDE *Cephalonomia stephanoderis* HYMENOPTERA:BETHYLIDAE) SOBRE *Hypothenemus hampei* (COLEOPTERA:SCOLYTIDAE) MULTIPLICADA EM DIETA ARTIFICIAL.
Amador Villacorta e Sônia M. Torrecillas 317

Sessão 5 – VALORIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA

A – Palestras

EXPERIÊNCIA BRASILEIRA NA VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE SUBPRODUTOS DA AGROINDUSTRIA DO CAFÉ.
Carlos Ricardo Soccol, Fan Leifa, Adenise L. Woiciechowski, Debora Brand, Cristina M. M. Machado, Marlene Soares, Pierre Christen e Ashok Pandey 323

EXPERIÊNCIA MEXICANA NA VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE SUBPRODUTOS DA AGRINDÚSTRIA DO CAFÉ.
Saucedo Castañeda G., Romano Machado J.M., Gutiérrez Sánchez G., Delgado Vidal F., Ramírez Romero G., Perraud Gaime I. 329

LOMBRICOMPOSTAJE DE LA PULPA DE CAFÉ EN MÉXICO.
Eduardo Aranda and Isabelle Barois 335

PROCESAMIENTO DE FRUTOS DE CAFÉ POR VIA HUMEDA Y GENERACION DE SUBPRODUCTOS.
Jaim Zuluaga Vasco 345

B – Posters

POTENCIALIDADE DE USO DE RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO AGROINDUSTRIAL DO CAFÉ.
Celso Luis Rodrigues Vegro e Flávio Condé de Carvalho 357

EVALUACION DE LA MADUREZ DE LA COMPOSTA DE PULPA DE CAFÉ.
Gloria Sánchez, Eugenia J. Olguín, Ricarda Marín y Gabriel Mercado 361

CAFFEINE DEGRADATION IN FRESH AND ENSILED COFFEE PULP BY SOLID STATE FERMENTATION: INFLUENCE OF SUBSTRATE PRETREATMENT AND INOCULUM LEVEL.
Romano-Machado J., Gutiérrez-Sánchez G., Perraud-Gaime I., Gutiérrez-Rojas M. y Saucedo-Castañeda G. 365

EVALUATION OF *Penicillium sp.* V33A25 CAFFEINASE ACTIVITY IN RELATION TO ITS CONSERVATION METHOD.
Gutiérrez-Sánchez G., Perraud-Gaime I., Augur C., Romano-Machado J.,Saucedo-Castañeda G. 373

PRODUCTION OF EDIBLE MUSHROOM *Lentinus edodes* ON THE COFFEE SPENT GROUND.
Fan Leifa, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol and Radjiskumar Mohan 377

SOLID STATE FERMENTATION AND PRODUCTION OF *Pleurotus ostreatus* ON THE COFFEE RESIDUES.
Fan Leifa, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol and Radjiskumar Mohan 381

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *Ceratocystis fimbriata* EM RESÍDUO SÓLIDO DE AGROINDÚSTRIAS DE CAFÉ.
M. Soares, P. Christen, A. Pandey, M. Raimbault e C.R. Soccol 385

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger* LPB 21 EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO COM CASCA DE CAFÉ.
Luciana P.S. Vanderberghe· Ashok Pandey, Jean-Michel Lebeault e Carlos R. Soccol 389

LA PULPA DE CAFE ES UN SUBPRODUCTO Y NO UN DESECHO.
Jose R. Ramirez Martinez 393

CARACTERIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA LAVAGEM E DESPOLPA DE FRUTOS DO CAFEEIRO E POSSIBILIDADES DE SEU USO NA FERTIRRIGAÇÃO.
Matos, A.T., Pinto, A.B. e Borges, J.D. 395

SELECTION OF STRAINS OF *Volvariella volvacea* AND CHARACTERISTICS ON THE EXTRACT OF COFFEE HUSK.
Fan Leifa, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol and Radjiskumar Mohan 397

DETOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA CASCA DE CAFÉ POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.
Debora Brand, Fernando Kawata, Ashok Pandey, Sevastianos Roussos, Maria Carolina Rocha dos Santos e Carlos Ricardo Soccol 401

CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE GA_3 POR FERMENTAÇÃO.
Cristina M. M. Machado, Carlos R. Soccol, Brás H. Oliveira, Carlos Oliveira e Ashok Pandey 405

SCREENING OF FILAMENTOUS FUNGI FOR THE PRODUCTION OFEXTRACELLULAR TANNASE IN SOLID-STATE FERMENTATION (SSF).
Van de Lagemaat, J., Augur, C., and Pyle, D.L. 409

PRODUCTION OF FUNGAL TANNASE IN A MODEL SYSTEM BY SOLID STATE FERMENTATION.
Cristóbal Noé Aguilar, Christopher Augur,Gustavo Viniegra-González , Ernesto Favela-Torres 413

Sessão 6 – QUALIDADE DO PRODUTO

A – Palestras

QUALIDADE DO CAFÉ SOLÚVEL BRASILEIRO.
Paulo Pauro de Oliveira 419

INFLUÊNCIA DA VARIEDADE BOTÂNICA SOBRE A QUALIDADE ORGANOLÉPTICA DO CAFÉ ESPRESSO.
Marino Petraco 421

A QUALIDADE DO CAFÉ PRODUZIDO EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.
José Guilherme Cortez 427

POTENCIAL DE MERCADO DE CAFÉS ORGÂNICOS E ESPECIAIS.
Ivan Caixeta 431

MYCOTOXIGESIS IN GRAINS APLICATION TO MYCOTOXIC PREVENTION IN COFFEE.
Joseph Le Bars and P. Le Bars 435

OCRATOXINAS E AFLATOXINAS EM CAFÉ BRASILEIRO.
Lúcia Valente Soares 447

B – Posters

RESULTADOS E DESAFIOS DO PROGRAMA DE AUTOFISCALIZAÇÃO DO CAFÉ TORRADO E MOÍDO: SELO ABIC.
Celso Luis Rodrigues Vegro e Célia Regina R. P.Tavares Ferreira 453

QUALIDADE DE BEBIDA DA CULTIVAR DE CAFÉ IAPAR-59 E OUTRAS.
Tumoru Sera e Marcos Aurelio Bacceti 457

EFEITO DA ADUBAÇÃO POTÁSSICA NA QUALIDADE DOS GRÃOS BENEFICIADOS DE CAFÉ.
Enilson De Barros Silva, Francisco Dias Nogueira, Paulo Tácito Gontijo Guimarães, Silvio Júlio De Rezende Chagas e Laerte Costa 459

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO EXSUDATO DE GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE DA BEBIDA.
Prete, C.E.C. e Abrahão, J.T.M. 463

RELAÇÃO ENTRE O PESO E A CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE GRÃOS DE CAFÉ DE PROGÊNIES DE ICATU.
Prete, C.E.C.; Sera, T. e Fonseca, I.C.B. 473

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE EXSUDATOS DE GRÃOS DE CAFÉ COLHIDOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO.
Prete, C.E.C.; Sera, T.; Crudi, C.E. e Fonseca, I.C.B. 475

AVALIAÇÃO DE PROGÊNIES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. cv. Icatu) QUANTO A CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO EXSUDATO.
Prete, C.E.C.; Sera, T. e Fonseca, I.C.B. 479

MELHORIA DE QUALIDADE EM ÓLEO DE CAFÉ PELO USO DA EXTRAÇÃO ACELERADA COM SOLVENTE(ASE).
Jair S.S. Pinto, Fernando M. Lanças, Suzana L. Nixdorf e Paulo L. C. Oliveira 483

INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM CAFÉ.
Marta Hiromi Taniwaki, Andréia Aparecida Banhe e Beatriz Thie Iamanaka 487

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO CAFÉ TORRADO E MOÍDO NO ESTADO DE SÃO PAULO.
Mori, E. E. M., Anjos, V. D. A . e Bragagnolo, N. 493

AQUISIÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DEMATURAÇÃO DE SEMENTES DE CAFEEIRO.
Delacyr da Silva Brandão Jr., Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira,Lilian Padilha, Rubens José Guimarães, José Roberto Bernardino Filho e Henk Hilhorst 499

EFEITO DE ADUBAÇÕES FOLIARES EM PRÉ E PÓS FLORADA NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DAS SEMENTES DE CAFEEIRO.
Lima, Dinara Mattioli; Von Pinho, Edila Vilela Resende;Vieira, Maria das Graças Guimarães Carvalho; Cunha, Rodrigo da; Guimarães, Rubens José e Monteiro, João Vieira 503

BIOTECNOLOGY AND THE FUTURE OF COFFEE PRODUCTION

Gustavo Viniegra-González.

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, D.F. MEXICO.

INTRODUCTION

Coffee is a crop from tropical countries, which, according to FAO statistics, has annual production averages around 4 million tons of green beans with sales between 6 and 12 billion dollars (Fig. 1 e fig 8). Coffee price has followed a typical oscillatory decreasing trend (Fig. 2) with wide fluctuations between coffee production and sales figures (Fig. 3). This oscillatory behaviour of coffee prices, has a main harmonic component with an average period, = 8.8 years and an average amplitude close to one $US/lb. This means that coffee market, as many markets for cash crops, has periodic booms and crashes that make difficult to plan the long term development of coffee producing economies. Therefore, any further technological and commercial development for coffee production should try to buffer those periodic market crises, by increasing the diversification of coffee outputs (valuable products and by products) and by a significant reduction of production and transformation prices (increasing yields and decreasing coffee benefit costs).

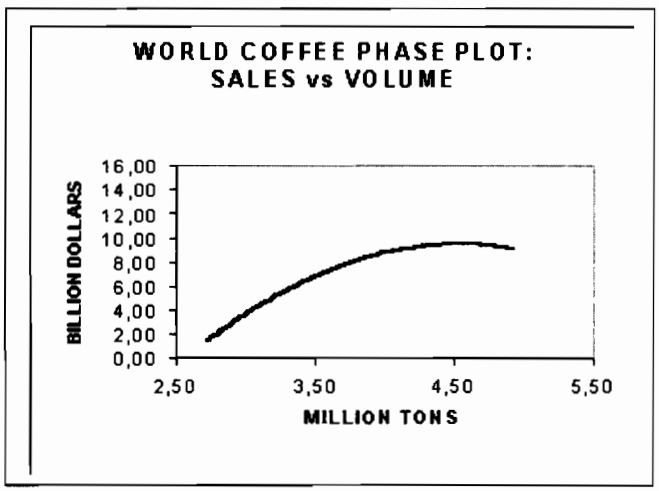


FIG. 1

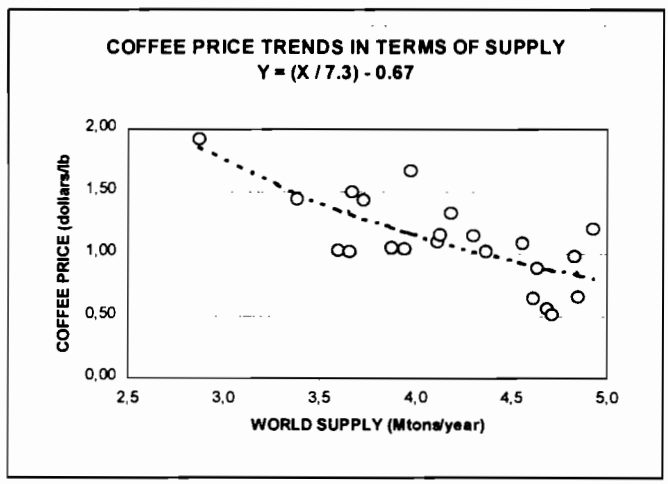


FIG. 2

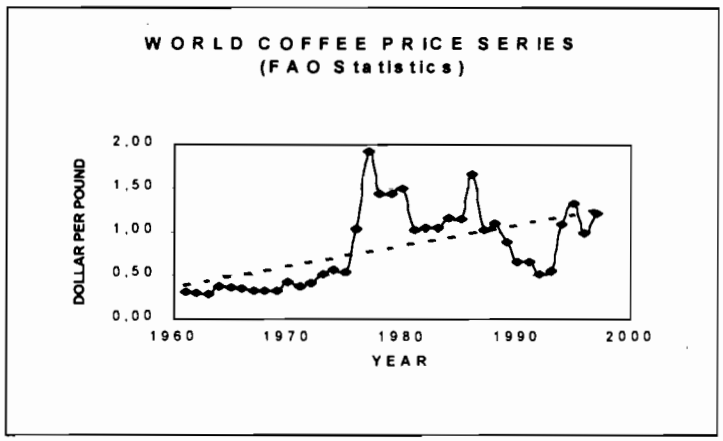


FIG. 3

The world trend to protect the environment is a major concern affecting coffee production and transformation, because many easy and ready techniques are to be discarded due to environmental considerations. For example, pest control using chemical compounds leaving toxic residues or, disposing of waste waters by the simple expedient to dump the untreated discharges in rivers or lakes. But, perhaps the environmental challenge may be a blessing in disguise. Specially, if new technologies introduced to meet environmental standards are, at the same time, oriented to increase the quality, diversity and commercial opportunities for coffee derivatives. For example, producing new varieties of organic coffee beans with better price, or giving rise to new high value added products from coffee pulp. (Table 1).

In this paper a brief overview is presented on the opportunities to use biotechnology to meet the challenge of rising coffee costs in fluctuating markets, with strong emphasis in the notion of product diversification.

THE NATURE OF MARKET OSCILLATIONS IN CASH CROP ECONOMIES

A dynamic model for coffee market.

A simple model illustrates some of the remarkable properties of coffee market. This is defined by three variables, X = the raw material in the producing country (green beans), Y = the intermediate material transported from the producing to the consuming countries and Z = the stocks of green beans to be processed and consumed .

$$\xrightarrow[V_O]{} X \xrightarrow[V_1]{} Y \xrightarrow[V_2]{} Z \xrightarrow[V_F]{}$$

The primary production rate, V_O, should be sensitive to the stock level, Z, because the price is a decreasing function of the stocks

$$V_o = V_i / [\,1 + (\,Z / K_i\,)^p\,] \qquad (1)$$

Where, K_i, is a saturation constant for the negative feedback between the stocks and the primary production. For small values of K_i, primary production is inhibited more readily than with high values of that parameter. The coefficient, $p > 1$, is an indication of the delay that exists between stock accumulation and the inhibition of coffee production.

Table 1: APROXIMATE CHEMICAL COMPOSITION OF THE COFFEE PULP

COMPONENT	%
Moisture	6,93
Dry Mater	93,07
Ethereous Ext.	2,5
Crude fiber	15,1
Nitrogen	1,32
Total protein Nx6,25	8,25
Ash	8,12
Extract free of N	59,1
Carbohydrates	74,1
Caffeine	0,75
Tannins	3,7
Calcium	0,32
Phosphorous	0,05
Potash	3,17
Sodium (ppm)	160
Iron (ppm)	250

Information from J. Zuluaga, 1989

At the end of the market chain there is the consumption rate, V_F, which is a convex function saturated by the market inventories, Z, because there is a maximal consumption rate, V_C, with a saturation constant K_C, as follows.

$$V_F = V_C Z / (K_M + Z) \qquad (2)$$

There are two other variables, X and Y, to consider in order to have a complete dynamic system which, follow the usual mass balance considerations.

$$Dx/dt = V_O - k_1 X \qquad (3)$$

$$dY/dt = k_1 X - k_2 X \qquad (4)$$

$$dZ/dt = k_2 X - V_F \qquad (5)$$

The bottleneck for agricultural ash products. This market will be at equilibrium if each one of the rates of change, dX/dt, dY/dt, dZ/dt, vanish together which lead to the so called steady-state conditions. This is possible only when V_O (input) = V_F (output). Figure 5 shows the graphical solution for such a condition. In one case the saturation level is high (i. e., K_i = 3 Mton) and in other case with K_i = 1 Mton (low level). Therefore, the market bottleneck is the final rate of consumption V_F because there is a maximum amount of coffee that consumers can buy and also because the rate of growth of consumers is rather low as compared to the rate of grow of production. Statistical evidence from FAO

statistics show that in fact, the main price trend is falling (Fig. 6) suggesting that production is overcoming consumption, because there is a definite negative correlation between coffee stocks and prices (Fig. 7).

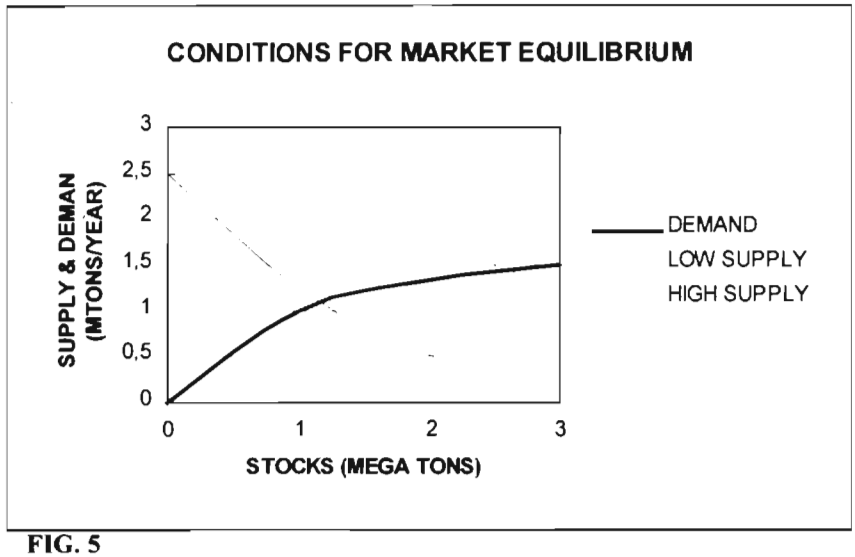


FIG. 5

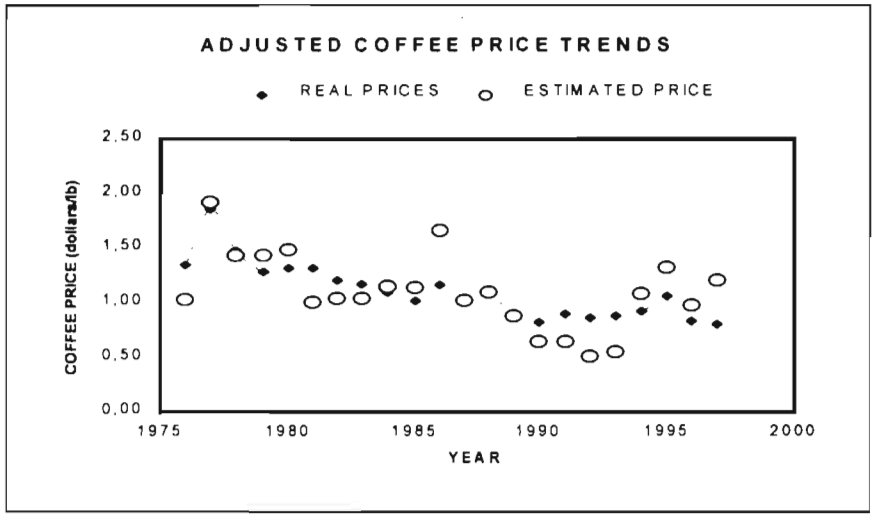


FIG. 6

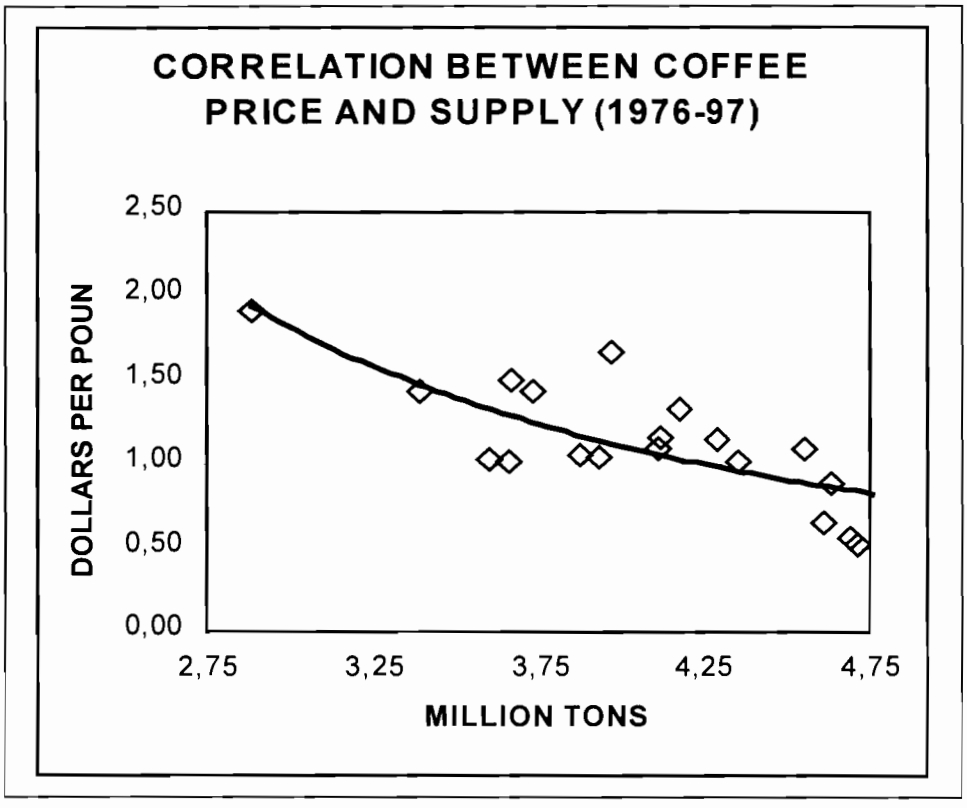


FIG. 7

The oscillating behaviour of supply and demand.

Market dynamics are now studied more carefully because, there is widespread evidence of price instabilities. Up to recently, it was assumed that market equilibria were inherently stable or, else, price fluctuations were completely random. Figure 8 shows unequivocal evidence of sustained coffee price oscillations with a main harmonic component having a periodo = 8.9 years. The source of those oscillations usually is a delay between the market final response (accumulation of inventories, Z) and the primary input (coffee bean production). Agricultural production may have oscillatory behaviour if there is a inevitable delay between planting, culturing and harvesting. For example, in coffee production the plant becomes mature after four of five years after being planted. This fact of life makes difficult to decide whether to stop and keep going with the production, even though the coffee prices have already fallen one or two years before. Another source of instability is the need to make market balances after the harvest has passed some months ago because makes a delay between price and production changes.

The model represented by the dynamic equations, 3 to 5, can be solved numerically as shown in the two kinds of market equilibria presented in (Fig. 9). The equilibrium point with high level of supply (K_i = 3 Mton) shows damped oscillations whereas the equilibrium point with low level of supply (K_i = 1 Mton) shows sustained oscillations. Such theoretical results seem to indicate that market behaviour can have sustained oscillations if there is a shortage of inventories. However the price of market stability is rather high, because stock accumulation is associated with low prices and financial losses for coffee producers. Therefore, the main question is how to stabilise the coffee market without incurring in price crisis Fig 10 . The obvious answer is to develop product and by product diversification which goes beyond the usual production of coffee as a beverage but also as a rich source of high price chemicals, specially from cheap and polluting materials such as coffee pulp and coffee bean residues.Fig 11

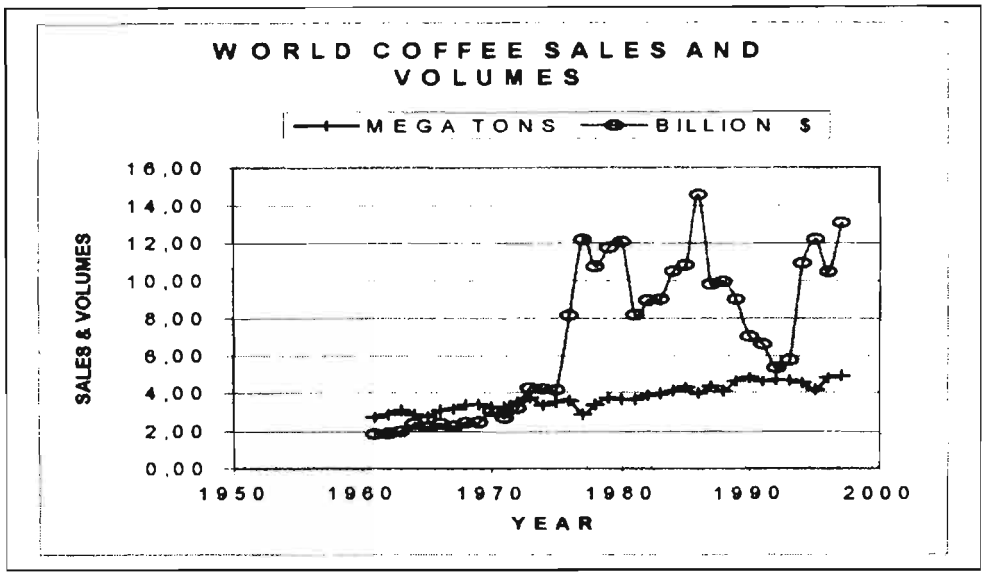

WORLD COFFEE SALES AND VOLUMES
MEGA TONS
BILLION $
SALES & VOLUMES
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
1950
1960
1970
1980
1990
2000
YEAR

FIG. 8

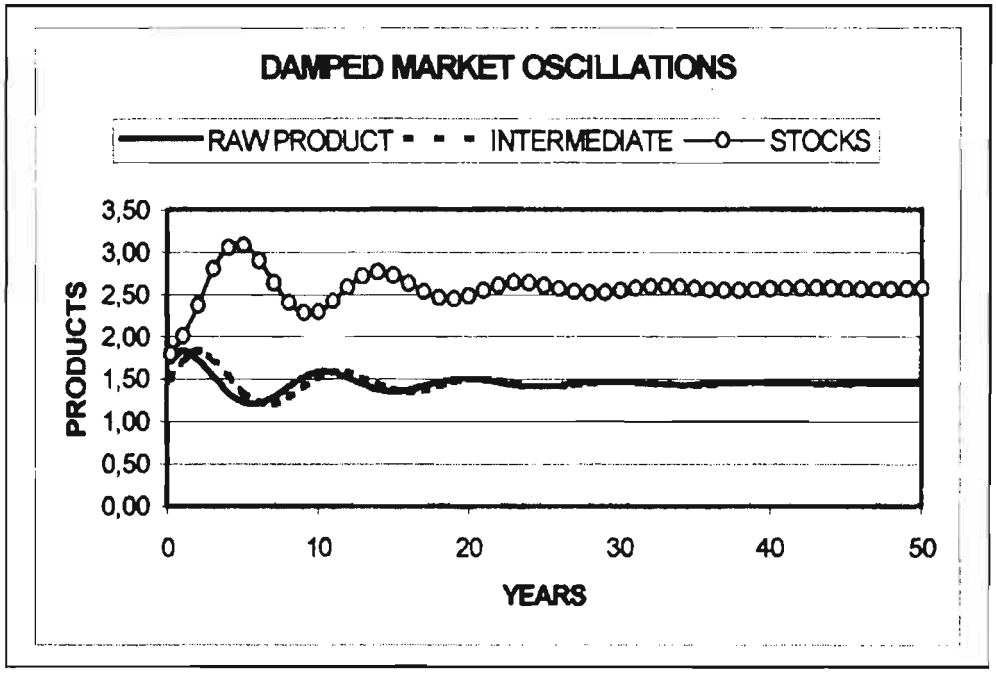

DAMPED MARKET OSCILLATIONS
RAW PRODUCT
INTERMEDIATE
STOCKS
PRODUCTS
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
0
10
20
30
40
50
YEARS

FIG. 9

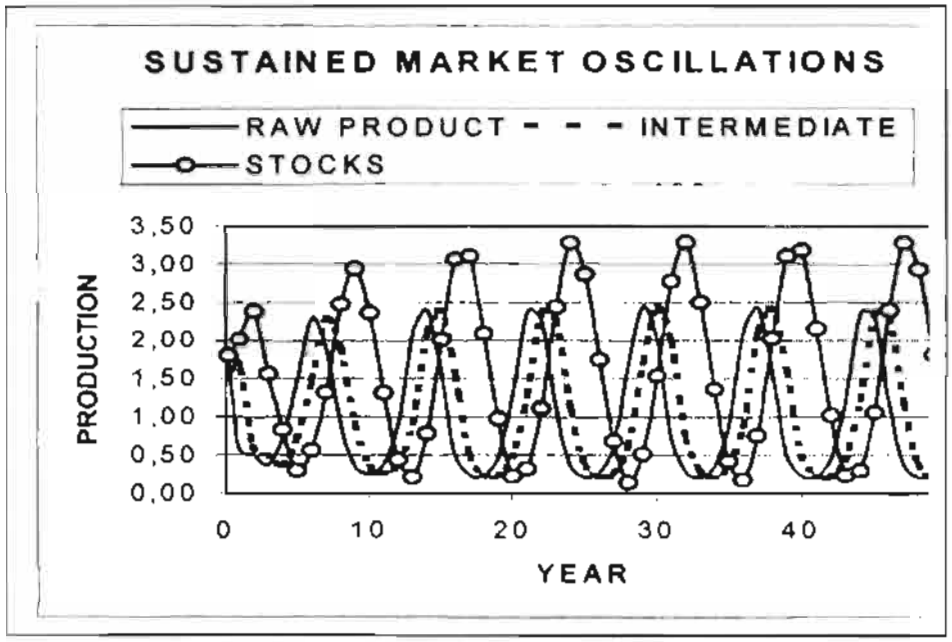

SUSTAINED MARKET OSCILLATIONS
RAW PRODUCT
INTERMEDIATE
STOCKS
PRODUCTION
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
0
10
20
30
40
YEAR

FIG. 10

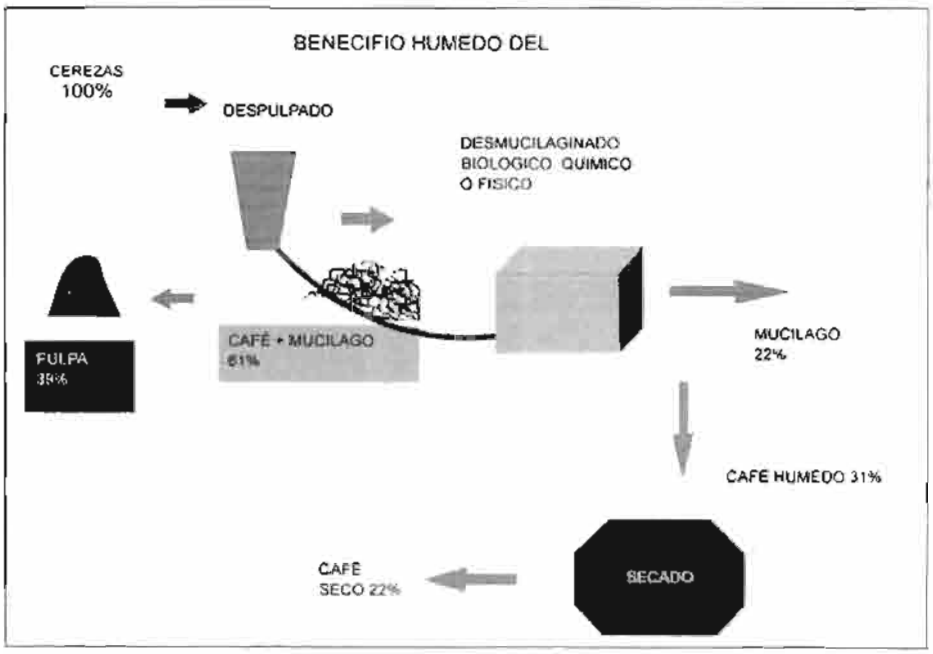

BENECIFIO HUMEDO DEL
CEREZAS
100%
DESPULPADO
DESMUCILAGINADO
BIOLOGICO QUIMICO
O FISICO
FULPA
39%
CAFÉ + MUCILAGO
61%
MUCILAGO
22%
CAFE HUMEDO 31%
SECADO
CAFE
SECO 22%

FIG. 11

The importance and the difficulties for product diversification.

Product diversification is well developed for crops such as cereals and legumes. For example, the large surplus of maize from U.S.A. is used to produce a wide variety of products such as, animal feeds, fructose syrups, alcohol, fermentation products, edible oil, starch, gluten, plastics, etc. In Brazil, sugar cane uses have been diversified to include the alternative production of gasohol as a way to cope with increasing fuel demands and saturation of sugar market. However there are many problems in finding successful alternative markets for traditional products such as coffee because of two main factors

a) The relative low level of R & D investment in tropical countries which hinders the discovery of new uses for traditional crops.
b) The complex web of social, cultural, political and financial arrangements that are associated to traditional crops and which cannot be changed overnight in order to develop new industrial concerns for alternative uses of conventional or waste products.

An interesting example of product diversification is the case of grape and wine industry in France. The traditional and main product for French grape yards is wine, but wine is also a product that has found market saturation through more than a century in Europe. To cope with this problem, the French government has issued a number of codes and regulations that help to manage wine surpluses and also are oriented to clean the environment. This is the network of distilleries producing liquor from the grape pomace or marc, as it is called the solid grape residue from wine making. There, a number of wine co-operatives get together and finance and manage a single distillery. The main role of such an enterprise is to produce brandy or "eau de vie" from the residual sugar in the pomace. Surplus amounts of grapes can also be transformed in liquors when the price of wine falls down working as alternative outlets for crop surplus. This scheme has various advantages,

a) There is no distraction for primary and traditional wine making.
b) Special factories are dedicated to new products with new ideas derived from R&D.
c) Surplus raw materials (grape) from primary producers can be transformed into new products, such as wine pigments, grape seed oil and grape sugar syrups, without entering the same market for the traditional or basic product, i.e., wine.
d) Waste materials (grape pomace) can be transformed in new value added products, helping to finance the cost of waste disposal.

It should be stressed that French distilleries were not developed as an answer to conventional market forces in the conventional sense of private supply and demand. They were an adaptation to a long series of political and social problems derived from wine market instability at the end of XIX century and now are becoming a response to the problem of waste disposal. In other wine making countries different ways of solving the problem of grape over production and waste disposal have been developed, suggesting that product diversification is a problem to be tackled in close relation to the social conditions of each given region.

THE PROBLEM OF PRODUCT DIVERSIFICATION FOR COFFEE DERIVED MATERIALS.

- Diversity of coffee raw materials in the pulp, the skin and the green beans.
- The conventional route of decaffeination and disposal of coffee pulp and torrefaction residues.
- Coffee pulp as a source of new materials (antioxidants and antitumoral derivatives).
- Alternatives for wet disposal and storage of coffee pulp.
- A rough estimate of cost/benefit analysis for R&D in coffee development.

- THE CHALLENGE OF ECOLOGY AND COFFEE PRODUCTION.

- OPPORTUNITIES FOR PRODUCT DIVERSIFICATION USING ECOLOGY FRIENDLY TECHNOLOGIES.

- THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY IN THE NEW CONTEXT OF COFFEE PRODUCTION AND MARKETING.

BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS AL MEJORAMIENTO GENETICO DEL CAFETO

Marc Berthouly

CIRAD-AMIS

1. GENERALIDADES

El café es uno do los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional. De esta actividad depende la economía de más de 50 países productores. Cultivado en 11,2 x 10^6 ha, y produjo, en 1990, 5,5 x 10^6 toneladas de café oro (Cafe Cacao Thé, 1992).

El café consumido en el mundo está principalmente producido por dos especies cultivadas: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* representan respectivamente el 75 y el 25 % del mercado mundial.

C. arabica está producido en regiones tropicales de altitud (500 a 2500 m.s.n.m.). Representa la única especie tetraploide (2n = 44 cromosomas) y autogama del género *Coffea. C. arabica* produce un café de calidad y con reducido contenido de cafeína. No obstante, es por la general sensible a las enfermedades como la roya anaranjada *(Hemileia vastatrix* Berk & Br.) y la antracnosis do los frutos *(Colletotrichum coffeanum* (CBD)), principales enfermedades de esta especie.

La metodologia de mejoramiento de *C. arabica* es la aplicada por la general a las especies autogamas. Tiene por base la obtención de descendencias puras por selección genealógica después de la recombinación de caracteres aportados par los padres.

Recentemente, la existencia de la heterosis fue señalada en *C. arabica* en Índia (Srinivasan y Vishveshwara, 1978), en Kenia (Van der Vossen y Walyaro, 1981) y en Etiopia (Ameha, 1983). Se trato aprovechar hibridos Fl multiplicados por via vegetativa pero sin éxito, dado que los métodos convencionales de propagación no permitieron más que reducidas tasas de multiplicación (Van der Vossen, 1985).

La multiplicación vegetativa desempeña por lo tanto un papel impartante en la selección de los cafetos. Permite la propagación y la explotación de las estructuras genéticas heterocigotos. También puede reducir el número de ciclos do selección. En efecto, en el cafeto, cultivo perene, crear una variedad requiere como mínima 35 años. La multiplicación vegetativa puede por lo tanto encontrar su aplicación en clones seleccionados de *C. canephora,* en híbridos interespecíficos seleccionados como el Arabusta, o bien en híbridos intraespecíficos de *C. arabica* tal como el Riuru 11.

La técnica de multiplicación vegetativa más utilizada en el cafeto es el esqueje. Sin embargo, debido al dimorfismo de los ejes vegetativos, el número de esquejes ortótropos que puede producir un cafeto se halla muy limitado. En el marco de una multiplicación a gran escala, la poca disponibilidad de esquejes puede llevar a plazas considerables para la divulgación de un nuevao clone. Además, el esqueje hortícola exige la instalación de jardines clonales, lo que implica diversas limitaciones entre ellas el mantenimiento y las superficies utilizadas (Deus y Descroix, 1984).

En este contexto, la puesta a punto de técnicas de multiplicación *in vitro* presenta un gran interés para incremientar la tasa de multiplicación y permitir una difusión rápida de los híbridos o de los clones seleccionadas.

Desde hace algunos años, varios autores (Staritsky, 1970; Sondahl y Sharp, 1977; Dublin, 1980, 1982; Pierson *et a!.,* 1983; Yasuda a at, 1985; De Garcia y Méndez, 1987; Berthouly *et* at, 1987) mostraron que el micro esqueje y la embriogénesis somática pueden aplicarse al cafeto.

La embriogénesis somática aparece coma una alternativa interesante y más económica para la multiplicación de plantas seleccionadas. Además de constituir un modelo interesante para estudios fundamentales, su aplicación más promisoria es la multiplicación de plantas a gran escala (Ammirato, 1987).

Distintos estudios sobre el cafeto permitieron evidenciar la aptitud de esta especie para la embriogénesis somática y para el desarrollo de los embriones en plántulas. No obstante, la tasa de multiplicación seguía siendo muy baja para una utilización a gran escala. En efecto, De Garcia y Mendez (1987) que trabajan sobre la embriogénesis somática en media sólido mencionan como producción "récord" 60 a 65 embriones par explant después de 14 semanas de cultivo.

Con el fin de explotar el relevante potencial de la embriogénesis somática y de reducir así el costo de producción de las plántulas, su aplicación en medio liquido resulta necesaria. En efecto, la posibilidad de (cultivar suspensiones celulares puede permitir el "scaling-up" y la producción masiva de embriones en bio-reactor. En otras especies, los resultados son muy promisorios.

Pétiard *et* a!. (1987) relatan una capacidad de producción de 80.000 embriones de zanahoria por litro y por dia en un bio-reactor de 10 litros.
Hasta ahora no existia un método comercial de multiplicación *in vitro* del cafeto.

2. ESTRATEGIAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *Coffea sp*

2.1. Mejoramiento convencional

2.1.1. *C. canephora*

2.1.1. 1.Generalidades

C.canephora es una especie allogama con una incompatibilidad de tipo gamétofitica monogénética (Berthaud ,1980);
El mejoramiento genético de dicha especie se hizo por dos vias: vía vegetativa a via generativa (Bouharmont et Awemo, 1979; Charrier ,1985).
El desarrolló de ténica de multiplicación vegetativa ha permitido la valorización de genotipos heterocigotos y en el mismo tiempo grande progresos en el mejoramiento genético de dichos cafetos(Charrier, 1985)

2.1.1.2. Métodos de selección

• *selección vegetativa:* so selección las mejores plantas con las caracteristicas deseadas. Dichas plantas so siembran en ensayos multi locales. Las mejores plantas seleccionadas serán utilizadas como "plantas madres" par ser multiplicadas en gran escala por vía vegetativa.
• *Seleccion generativa*: desde muchos años se esta realizando una nueva estrategia de mejoramiento llamado " selección recurente reciproca".
La primera fase del trabajo consiste en la creación de poblaciones de dos grupos de dos diferentes origen: guinea y congo. En estos grupos so hace hibridaciones entre los diferentes individuos durante varios ciclos hasta obtener plantas seleccionadas (híbridos).
La segunda fase consiste en la creación de híbridos entre los dos grupos mejorados para junta en una misma planta las mejores características genéticas de los dos grupos (Berthaud, 1985; Charrier et Berthaud .1988)
Dichas plantas mejoradas pueden ser utilizadas por la creación do campo de semillas híbridas. Actualmente un tal programa so esta llevando a cabo an Costa de Marfil por el Cirad y la institución nacional.

2.1.2.*C.arabica*

2.1.2.1. Generalidades

Las plantaciones de *C. arabica* en los países productores de América Central y de Asia del Sur y del Sureste fueron constituidas originalmente a partir de un número muy limitado de plantas (Coste, 1968). En consecuencia y debido a su carácter autogamo, los *C. arabica* cultivados tienen una base genética limitada. Charrier (1980, 1985) hizo especialmente énfasis en el interés por prospectar cafetos espontáneos así como su conservación y su integración en los programas de mejoramiento.
Las prospecciones de La FAO en 1964 y del ORSTOM en 1966, han contribuido a la ampliación de la base genética de numerosas colecciones de *C. arabica* con cafetos de origen subespontáneo del suroeste etíope (Charrier, 1985).
La aparición de más de 40 mutantes en las plantaciones de Brasil contribuyó a la creación de nuevas variedades tales como Maragogype, Cera y Caturra (Carvalho, 1988). Entre estos mutantes, varios presentan un interés practico para el mejoramiento de esta especie (Van der Vossen, 1985). Por ejemplo, el mutante Caturra caracterizado por un crecimiento compacto fue utilizado en varios programas de mejoramiento. Su tamaño reducido permite cultivarlo en altas densidades e incrementar asimismo la productividad.

2.1.2.2. Criterios y métodos de selección

En el caso de *C. arabica,* se enfocaron los criterios de selección en la adaptación a las condiciones ecológicas regionales, en el rendimiento y la calidad. En un pasado recente, los trabajos fueron orientados principalmente hacia la creación de variedades resistentes a la roya anaranjada y a la antracnosis de los frutos. Estas dos enfermedades constituyen el problema fitosanitario más serio para *C. arabica.*
La metodologia tradicional seguida para seleccionar *C. arabica* fue principalmente la hibridación y luego la selección genealógica y la seleión por retro cruzamiento (Charrier, 1985; Bettencourt y Rodrigues, 1988). Las variedades así logradas son suficientemente homogeneas para permitir una multiplicación por semilla. Así, prácticamente se instalaron todas las plantaciones de *C. arabica* con semilla (Van der Vossen, 1985). Un descubrimiento interesante que subrayar, es la existencia de la heterosis en el cafeto *C. arabica.* Fue referido en Índia (Srinivasan y Vishveshwara, 1978), en Kenia (Van der Vossen y Walyar, 1981) y en Etiopia (Ameha, 1983). La heterosis puede explotarse para la creación de variedades híbridas Fl, lo que modificaria radicalmente la estrategia clásica de selección (Charrier, 1985). Los ensayos de multiplicación por via vegetativa tradicional do hibridos Fl no tuvieron exito. La producción de

hibridos se realiza mediante cruzamiento manual controlado de los padres (Van der Vossen, 1985).

2.1.2.3. La selección para la resistencia a las enfermedades

Los programas de investigación sobre el cafeto en Brasil, en Colombia, en India, en Portugal y en América Latina, se dirigen principalmente hacia el mejoramiento de las variedades cultivadas mediante transferencia de los factores de resistencia *Hemileia vastatrix* (Bettencourt, 1982). La fuente de resistencia mas utilizada es el híbrido do Timor, oriundo de la introgresión natural de *C. arabica* por los *C. canephora* indonesios. Este híbrido posee 4 genes mayores de resistencia procedente de *C. canephora* (Bettencourt y Rodrigues, 1988).

El cruzamiento del híbrido de Timor con el mutante enano Caturra Rojo dio la variedad Catimor, la cual se estudia en varios centros de investigación del mundo (Bettencourt, 1982). El híbrido de Timor entró en otras combinaciones y llevó a la obtención de las variedades Catimor y Sarchimor (Bettencourt, 1983).

En el cafeto, el retro cruzamiento se utiliza para la introducción de caracteres (resistencia a las enfermedades, vigor, caracteres del fruto, etc...) que le faltan a la variedad interesante utilizada como padre recurrente,

El Catimor, variedad resistenre a la roya anaranjada, logrado por el "Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro" (CIFC) fue retro cruzado con la variedad Catuai para transmitirle el carácter de vigor (Carvalho, 1988). En efecto, varios investigadores señalaron la falta de vigor en los Catimor (Bettencaurt, 1982; Zamarripa, 1986).

En el transcurso de los últimos 25 años, el Instituto Agronômico de Campinas en Brasil desarrolló la variedad Icatu, derivada de un cruzamiento artificial entre un *C. arabica* tetraploide y un *C. canephora* tetraploide logrado por tratamiento con colchicina. El híbrido F1 fue retro cruzado con Mundo Novo y también con otras variedades de *C. arabica*, tales como Bourbon Amarillo y Catuai. Las poblaciones de Icatu mas eficientes son derivadas de S2 a S3, de BC2 y BC3 (Carvalho, 1982, 1988).

La variedad Icatu contiene genes de resistencia a la roya pero también al CBD y a los nematodos (Carvalho, 1988). Actualmente, la selección de varias descendencias de Icatu parece muy adelantada a tal punto que debe examinarse su divulgación (Eskes, 1991).

Estudios sabre el control genético de la resistencia indicaron la existencia de por lo menos nueve genes dominantes de resistencia a *Hemileia vastatrix* (Bettencourt y Rodrigues, 1988). La resistencia incompleta de *C. arabica a H. vastatrix* fue objeto de investigaciones. Los resultados logrados en Brasil muestran la existencia de una resistencia horizontal en poblaciones de *C. arabica* y de *C. canephora*, variedad Kouillou (Eskes, 1983).

La antracnosis de los frutos (CBD) es una enfermedad muy grave de *C. arabica* cultivado en las zonas altas, húmedas y frías, de África Central y Oriental. La CBD no so encuentra en los países de América Latina, pero las condiciones climáticas de altitud son comparables a las regiones de cultivo del café de África del Este (Van der Vassen, 1985). Esta enfermedad presenta por la tanto un furte peligro potencial para el cultivo del café de América.

El programa de selección para la resistencia al CBD siguió dos estrategias diferentes. En Kenia, el programa de mejoramiento iniciado en 1971, consistió en la introgresión de resistencia al CBD procedente del germo plasma de *C. arabica* selvaje en variedades regionales tomando la precaución de mantener la calidad y la productividad del café típico de Kenia.

Los trabajos llevadas a cabo en Etiopia se dirigieron hacia la selección y la multiplicación de genotipos resistentes al CBD seleccionados entre poblaciones semi-naturales del centro de diversidad genética do *C. arabica*. La productividad y la calidad tuvieran el segundo rango en estos trabajos (Van der Vossen, 1985).

Estudios realizados par Van der Vossen y Walyaro (1980) indicaron que la resistencia al CBD esta controlada por dos genes mayores de la variedad Rume Sudan (un gen dominante R y un gen recesive K), y por un gen del hibrido de Timor (T), de dominancia incompleta.

Cabe anotarse que también se verificaron avances de mejora genética de los cafetos para la resistencia a los nematodos, *Meloidogyne* sp y la resistencia a las minadoras de las hojas *Perileucoptera coffeella* (Eskes, 1991).

Desde 1991 se ha iniciado en América Central un programa de mejoramiento gangetico en base a la creación de híbridos F1 de *C.arabica*.

2.1.2.4. La hibridación inter y intraespecífica:

• *hibridación inter especifica*

La hibridación inter especifica fue utilizada en el cafeto para la transferencia de caracteres particulares a las variedades regionales. El tipo de mejoramiento genético en América y en África fue dirigido en el híbrido inter especifico entre *C. arabica* y *C. canephora* con dos objetivos principales pero diferentes acorde al pais: mejorar la calidad del café robusta e introducir el vigor y

la resistencia a las enfermedades de robusta a *C.arabica.*

En Costa de Marfil, Capot (1972) ernprendió la hibridación entre estas dos especies con el objetivo de reunir en un nuevo cafeto, rusticidad, productividad y resistencia a la roya de *C. canephora* y valor organoléptico y bajo contenido de cafeína de *C. arabica.*

Pudo superarse el obstáculo de la esterilidad causado per los diferentes niveles de ploidia al cruzar genitores *C. arabica* por genitores *C. canephora* autotetraploides, lagrados después de tratamiento con colchicina. Per selección clonal, dentro de estos híbridos heterogéneos, se seleceionaron varias formas interesantes al nivel agronómico y se difundieron bajo el nombre de Arabusta.

En Brasil, se encuentra otro ejemplo del use de la hibridación inter especifica, donde se consiguió transferir a *C. arabica* caracteres de resistencia a la roya anaranjada y a los nematodos, procedente de *C. canephora.* Por selección de los individuos equilibrados, después de 4 a 5 ciclos de back-cross con el padre *C. arabica,* asimismo se crearon cafetos tetraploides fértiles y resistentes, llamados Icatu Vermelho e Icatu Amarelo (Carvalho, 1988).

La hibridación inter especifica oferece un gran potencial de mejoramiento genético relacionado con numerosas especies de *Coffea.* Estas poseen caracteres originales e interesantes de arquitectura, de floración y de fructificación, de adaptación pedoclimatica, de comportamiento frente a enfermedades y parasitos y, de valor cualitativo del café.

Hibridos como Congusta resultan del cruzamiento *C. canephora x C. congensis* y aparecen como un material interesante por sus caracteristicas agronómicas (Charrier y Berthaud, 1988).

Con el objetivo de mejorar la especie *C. canephora* cultivada, se lleva igualmente a cabo un programa de hibridación inter especifica en Costa de Marfil que deja intervenir especies cemo *C. congensis, C. eugenioides, C. liberica* y *C. dewevrei* (Louarn, 1987).

• ***Hibridacion intra especifica***

La hibridación intra especifica fue hasta pocos años muy poco utilizada debido a la base genética estrecha que habla en los países y también a no tener una técnica de multiplicación vegetativa fiable

Hace 20 anos Van Der Vossen inicio este programa de híbridos Fl en Kenya. con selecciones nacionales y catimor colombiano. Existe también un programa semejante en Tanzania. En los dos casos dichos selecciones no estan realmente por la falta de una técnica de multiplicación vegetativa.

Desde 10 años Cirad Promecafe y los países Centro americanos un programa de creación varietal intra especifica con variedades comerciales y silvestres (de Etiopia) Este programa pudo ser iniciado porque disponemos actualmente de una técnica de multiplicación vegetativa.

2.2. TÉCNICAS CONVENCIONALES DE PRODUCCIÓN DE MATERIALES PROMISORIOS:

2.2.1. Las semillas

En la naturaleza, el cafeto se reproduce por semillas. En cultivo, el cafeto puede ser multiplicado medíante técnicas arborícolas tales como el esqueje y el injerto (Coste, 1968). Para la multiplicación vegetativa, se pueden utilizar más que tallos ortótropos con motivo del dimorfismo vegetativo de los cafetos. Cualquier esqueje de plagiotropo lleva a un cafeto de porte rastreando sin interés práctico (Coste, 1968).

2.2.2. El esqueje

La multiplicación vegetativa se práctica sobre todo en *C. canephora* y el híbrido arabusta debido a la imposibilidad de reproduccion conforme par vía sexuada de los individuos escogidos. En *C. arabica,* en cambio, donde la reproducción conforme puede lograrse por semillas, la multiplicación vegetativa en condiciones hortícolas se utiliza menos. Además es más primorosa, por lo menos para el esqueje.

Esta técnica conocida en el cafeto desde hace mucho tiempo (Coste, 1968) es actualmente más utilizada (Deuss y Descroix, 1984; Cambrony, 1989) en *C. Canephora.*

Se preparan los esquejes a partir de entrenudos de chupones ortótropos tomados en clones dando buenos resultados. El tallo se corta a los 4-5 cm por debajo de cada nudo y justo encima de la base de los pecíolos. Los segmentos comprenden un nudo y 2 hajas cortadas por la mitad o en la tercera parte de su largo. Estos segmentos se seccionan luego longitudinalmente para obtener asimismo 2 esquejes clivados que llevan cada uno una hoja (Boudrand, 1974). Después de tratamiento de la base con un producto auxinico, los esquejes se colocan en tanques de esqueje. El substrato de arraigo puede ser arena, aserrín, parche de arroz.

La tasa de enraizamiento varia acarde a los clones, al estado fisiológico de los esquejes y al período del año (Cambrany, 1989). Así, Boudrand (1974) con clones de *C. canephora* relata un arraigo

medio del 60 al 90 % de las esquejes puestos en tanques. Cambrony (1989) refiere una tasa de éxito del 60 % después de 8 semanas y del 80 % después de 12 semanas. También señala que en un proyecto de instalación, habida cuenta de las incertidumbres del medio ambiente normal de un vivero, el rendimiento medio por contar con sería del 50 %. La producción anual de un jardin clonal de *C. canephora* es de 150 a 200 esquejes por pié, o sea 2,7 millones a 3,6 millones de esquejes por hectarea y por año (Cambrony, 1989).

2.2.3. El injerto

Mas a menudo se reserva esta técnica a las manipulaciones del materíal vegetal en los centros de investigaciónes. Couturon y Berthaud (1979) mencionan que en Costa de Marfil, los investigadores del ORSTOM practican corrientemente el injerto, con miras a mejorar el crecimiento de certas especies y de certos híbridos o reducir la duración de las generaciones.

No obstante, cabe señalarse que en certos países latinoamericanos, tal coma Guatemala, el injerto do *C. arabica* en *C. canephora* es una práctica muy utilizada para controlar los nematodos.

Las técnicas de injerto utilizadas son muy clássicas: injerto de púa por rajadura, injerto por aproximación (Coste, 1968; Cambrony, 1989). Couturon y Berthaud (1979) instrumentaron la técnica de injerto de embriones de cafetos, cuyo interés principal es la recuperación de materíal quo no se hubiera podido salvar en condiciones normales de germinación de las semillas. Esta ténica permite el desarrollo de certos híbridos entre especies de cafetos genéticamente apartados.

3. LAS BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS A COFFEA SP

3.1.Generalidades

La biotecnologla es un conjunto de técnica aplicadas a un organismo, parte de un organismo, entidades sub-celulares, o proceso biológico".

Desde mas de 20 años dichas técnica son cada dias mas utilizadas en la agricultura, para tratar de responder mas rapidamiente a los problemas que enfrenta dicha agricultura moderna.

3.2.Ténica de micropropagación *in vitro*

Por las técnicas de cultivo *in vitro,* se conecen dos vías de multiplicación vegetativa del cafeto:el micro esqueje y la embriogénesis somática.

3.2.1. Micropropagacción mediante microestacas

Generalidades

La técnica de micro esqueje del cafeto fue desarrollada por Dublin (1980, 1984) y Custers (1980), el principio de esta técnica tiene por base la del esqueje hortícola pero realizado *in vitro* cuyo objetivo es favorecer la caulogénesis.

Tiene por finalidad de inducción *in vitro* de yemas axilares existentes al nivel do los nudos ortótropos, su desarrollo y su multiplicación en serie. Esta técnica comprende tres fases esenciales:

- Instalacción del material vegetal *in vitro* y obtención de micro tallos ortótropos: fase más delicada y difícil debido a una polulación de bacterías y de hongos unos días después de la instalación de los explantes en el medio, y la produción de los fenoles. Todos estos factores llevam a uma muerte más o menos rápida de los explantes.
- Multiplicación em serie de estas plántulas clonales.
- Enraizamiento e aclimatación de estas plántulas clonales.

La técnica

Inducción *in vitro* de yemas axilares

Los explantes provienen de tallos ortótropos de plantas en invernadero, en vivero o en el campo. Por lo general se utilizan los 4 a *5* primeros nudos.

Multiplicación *in vitro* de los micro tallos oriundos de la inducción de yemas axilares

Unas 12 a 14 semanas después de la puesta en cultivo, las yemas axilares desborradas evolucionan en tallos suficientemente desarrollados (3 a 4 pares de hojas), para ser tomados y subdivididos en tantos micro esquejes.

Se utiliza una sola citokinina, la B.A.P. (Benzilaminopurina en diferentes concentraciones de *0,5* a 3 mg/l.)

Se observa que demasiado fuertes dosis de citokinina incrementan el número de micro tallos pero reduce el tamaño de los entrenudos, lo que representa un problema para la multiplicación de estas plántulas clonales.

Los micro esquejes se siembran por 4 en un frasco de *5* cm de *0* y 20 cm de altura. Cada 90 días estas plántulas clonales se subdividen nuevamente: se logra un promedio de 30 a 35 micro esquejes por maceta, o sea un promedio de 7 a 9 micro esquejes por explant.

Aclimatación de las plántulas clonales

Unas 10 semanas después de su puesta en cultivo, las plántulas clonales tienen un desarrollo suficiente para ser tomadas y transferidas en un medio de arraigo ya sea sólido, ya sea líquido. En medio sólido, las raíces no desarrollan pelos absorbentes. Resulta preferible hacer la inducción

en medio líquido. Para esto el medio de base esta constituido por los elementos minerales del media de Murashige y Skoog, adicionados de vitaminas de Morel y de sacarosa a 10 gr/l. Dos auxinas: el A.N.A (ácido naftaleno acética) y el A.I.B. (ácido indolbutirico) se utilizan en dosis respectivas de 50 mg/l a 100 mg/l y de una citokinina *(25* mg/l). Esta inducción se hace en medio líquido no estéril durante 24 horas.

Después de la inducción radicular en laboratorio, la aclimatación se hace directamente en vivero en un substrato esterilizado a la calor y compuesto de 3 volúmenes de tierra, 2 volúmenes de arena, 1 volumen de pulpa de café envejecido u otro producto químico o mantillo.

Se realiza en general bajo "túnel" plástico durante 1 mes y bajo sombra (25 % de la luz). Se logra una retoma de las plántulas clonales de más del 95 %

3.2.2. Micropropagación mediante embriogénesis somática

Generalidades

La célula vegetal posee una característica importante, la totipotencia, que demuestra que cada célula contiene todo el potencial genético para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico a la célula madre.

La embriogénesis somática se define como el desarrollo de embriones a partir de células somáticas. Estos embriones somáticos se desarrollan al pasar por las fases (globular, codiforma, torpilla, cotiledonario) idénticas a las del embrión zigótico (Ammirato, 1987). Estos embriones poseen una estructura bipolar (meristemos radicular y caulinar).

Este modo de reproducción asexuada, que existe al estado natural en ciertas especies (Tisserat *et al.*, 1979) fue desde los años 1960 amplamente estudiado mediante el cultivo *in vitro.* Los primeros ejemplos de embriogénesis somática fueron señalados por Steward *et al.* (1958) y por Reinert (1958) a partir de células de *Daucus carota.* Treinta años después, la embriogénesis somática fue descrita en más de 130 especies perteneciendo a 30 famillas diferentes (Thorpe, 1988).

La técnica

Los primeros trabajos de embriogénesis somática sobre el cafeto fueron publicados por Staritsky (1970). Consiguió el desarrollo de cales vigorosos a partir de explantes de tallos de *C. arabica, C. canephora* y *C. liberica,* pero solos los cales de *C. canephora* se diferenciaron en embriones somáticos y plántulas.

Sharp *et al.* (1973), trabajando sobre distintos explantes de *C. arabica,* relatan que el potencial morfógeno varia acorde al explant utilizado. Así, los cales logrados a partir de tallos plagiotropos no son morfógenos, los oriundos de hojas forman raíces, los oriundos de anteras forman pro-embriones y los logrados a partir de tallos ortótropos forman plántulas.

Investigacianes realizadas en el transcurso de los últimos viente años permitieron concluir que la embriogénesis somática puede ser inducida a partir de explantes de origen variado:

- tallos (Dublin, 1980; Staritsky y Van Hasselt, 1980),
- hojas (Herman y Hass, 1975; Sondahl y Sharp, 1977; Dublin, 1981; Yasuda *et at.,* 1985),
- ovulas (Lanaud, 1981),
- anteras (Ascanio y Arcia, 1987),
- protoplastas (Spiral y Pétiard, 1991; Acuna y Pena, 1991).
- hojas(Berthouly y Michaux-Ferriere)

Estos resultados demuestran la aptitud de esta especie para la regeneración. No obstante, depende mucho de la naturaleza y del origen del explant. Así, existe una gran diferencia de reacción entre tallo o hoja o entre especies, por ejemplo, entre *C. canephora* o *C. arabica* (Staritsky y Van Hasselt, 1980).

Para conseguir l a diferenciación de los diversos tipos de explantes, se utilizó una gran variedad de secuencias de medios nutritivos. De manera general, la embriogénesis somática puede lograrse acorde a 2 estrategias:

1. en una sola fase por cultivo de los explantes en un media único. En este caso el medio puede contener ya sea una citokinina sola (Dublin, 1981; Yasuda *et al.* 1985), ya sea una auxina y una citokinina en asociación (Dublin, 1980; Pierson *et al.*, 1983).

2. en dos fases por cultivo de explantes en un primer medio de cultivo para iniciar una proliferación de cales, y luego en un segundo para desarrollar células embriogenas en embriones (Söndahl y Sharp, 1977; Dublin, 1984, Berthouly y Michaux-Ferriere 1996).

Sondahl y Sharp (1977) describen dos secuencias de diferenciación morfogénetica a partir de explantes foliares de *C. arabica* que fueron llamadas "High Frequence Somatic Embriogénesis" (HFSE) y "Low Frequence Somatic Enibriogénesis" (LFSE).

"LFSE' està caracterizada pOr la aparición de embriones aislados bien constituidos (1 a 10 por explant) observados después de 13-15 semanas en el medio de inducción. En "HFSE", los embriones se desarrollan a partir de cal friable, este mismo oriundo de un cal primario. Los embriones aparecen más tardiamente que en el caso de LFSE

(16 a 20 semanas). En los cultivos s de tipo "HFSE", a cantidad de embriones varia de 50 a 100 embriones (Söndahl y Sharp, 1977).

Dublin (1980, 1984) menciona que el proceso de embriogénesis somática en el genero *Coffea* se distribuye acorde a 3 fases:

- la fase de caulogénesis se desarrolla en la obscuridad (4 semanas) en un medio que contiene reguladores de crecimiento: una o dos auxinas (2,4 D, A.I.B.) solas o en combinación, y una citokinina (BAP, 2ip).
- la fase de diferenciación se desarrolla a la luz indirecta en medio que contiene una citokinina sola (BAP) o en asociación con una auxina (2,4 D). Esta fase dura 8 a 10 semanas.
- La fase de desarrollo de los embriones en un medio que contiene A.I.A. y kinetine al BAP solo. Esta fase dura 10 semanas. En este medio los embriones se desarrollan hasta la formación de plántulas de 3 a 4 pares de hojas aptas a la transferencia en invernadero.

Staritsky y Van Hasselt (1980) publicaron el primer trabajo sobre la embriogénesis somática en medio líquido en *C. canephora*. Tiene por base la explotación de embriogénesis adventiva. En este método, se utiliza e cal logrado en medio semi-solido (6-8 semanas) para iniciar el cultivo en medio líquido. Los primeros embriones (500-1000) aparecen 8 a 10 semanas después de la transferencia en medio liquido. Las producciones ulteriores de embriones se consiguen entonces por brote de los embriones y por formación de *novo* a partir de los agregados celulares. Estos autores notan la necesidad de estudiar los aspectos cuantitativos del procedimiento y los problemas de aclimatación de las plántulas *in vitro*.

Poniendo de lado los trabajos anteriores, otros autores utilizaron el medio líquido para la fase de diferenciación, para mejorar la embriogénesis somática (De Pena, 1983). No obstante, no consiguieron suspensión celular mantenida por trasplante regular.

El exemplo de suspensiones celulares embriogenas de cafeto fue relatado ya sea con el objetivo de una producción masiva de embriones (Zamarripa *et al.*, 1991), ya sea como material de inicio para el aislamiento de protoplastas y su regeneración ulterior (Spiral y Pétiard, 1991; Acuna y Pena, 1991).

Factores inportantes para la embriogénesis somática

La formación de embriones somáticos parece ser el resultado de una interacción muy estrecha entre diversos factores. Así, Rangaswamy (1986) relata que casi 50 substancias perteneciendo a unas 10 clases de compuestos orgánicos e inorgánicos, jugos naturales, extracto de plantas y algunos factores físicos se describieron como pudiendo influenciar la embriogénesis somática.

Medios de cultivo

Entre los componentes del medio de cultivo más estudiados, se puede citar las auxinas. En efecto, el proceso de la embriogénesis se inicia muy a menudo en un medio que contiene auxinas, mas corrientemente 2,4-D (Ammirato, 1983).

También se conocen las citokininas para desempeñar un papel en la maduración de los embriones somáticos. Fujimura y Komanine *(1975)* observaron una especificidad de las necesidades en citokinina: la zeatina favorece la embriogénesis de las suspensiones celulares de *Daucus carota*, mientras que la BAP y la kinetine la inhiben. Por otro lado, la BAP se menciona como teniendo influencia en la embriogénesis somática de *Coffea arabica* y del híbrido Arabusta (Dublin, 1981; Yasuda *et al.*, 1985).

El ABA desempeña un papel en la maduración y la germinación de los enbriones (Ammirato, 1977). Se puede citar a título de ejemplo el efecto favorable del ABA en la maduración y la germinación de los embriones somáticos de *Glycine max* (Ranch *et al.*, 1985) y de *Picea abies* (Boulay *et at.*, 1988). En cambio, Tisserat y Murashige (1977a) indican que el ABA inhibe la inducción de las embriones somáticos de *Daucus carota*.

También se ha descrito a menudo la importancia del nitrógeno y de certos ácidos aminados. El nitrógeno desempeña un papel esencial a la vez en la iniciación y en la maduración de los embriones (Ammirato, 1983). Los ácidos aminados, y especialmente la glutamina, parecen desempeñar un papel particular (Ammirato, 1983). La prolina mejora la embriogénesis en *Zea mays* (Armstrong y Green, 1985). En la soya *(Glycine max)*, la glutamina, la alanina y la asparagina son factores importantes para el crecimiento de suspensiones embriogenas (Finer y Nagasawa, 1988).

La sacarosa es la fuente de carbono más eficaz (Gautheret, 1959) aunque otros azúcares mostraron efectos favorables. Por ejemplo, la maltosa estimula la embriogénesis somática en *Daucus carota* (Kinnersley y Henderson, 1988) y *Glycine max* (Obendorf y Slawinska, 1988).

Medio ambiente gaseoso y físico

La diferenciación puede también controlarse mediante la concentración de oxigeno disuelto. En *Daucus carota* y *Triticum aestivum* concentraciones reducidas de oxigeno favorecen la embriogénesis somática. Al contrario, los cultivos de *Medicago sativa* necesitan

concentraciones altas de oxigeno para la diferenciación embrionar (Stuart *et al.*, 1987).
Se menciona a menudo el papel del etileno en la embriogénesis (George y Sherrington, 1984). Tisserat y Murashige (1977b) relatan que el etileno inhibe la iniciación de los embriones de *Citrus reticulata* y de *Daucus carota*..
Se mencionaron hace de eso mucho tiempo los efectos en la embriogénesis somática de otros factores del medio ambiente como la luminosidad y la temperatura (Ammirato, 1983).

Densidad celular

La densidad celular fue señalada como un parámetro relevante para el crecimiento de las suspensiones celulares. Halperin (1967) menciona que la producción de embriones somáticos de muestra de perforación esta influenciada por la densidad celular. Por debajo de un umbral crítico la maduración de embriones se halla inhibida.
Hari (1980) muestra, para una suspensión de zanahoria, que existe una relación linear entre la densidad celular a la inoculación y número de embriones producidos y los cultivos de células, de muy baja densidad o, al contrario, muy alta no expresan la totalidad de su potencial embriogénico. Este autor muestra que el crecimento de embriones somáticos por debajo de un umbral mínima de densidad puede mejorarse al agregar un medio "acondicionado".
Mas recentemente, Ozawa y Komamine (1989) indican que la densidad de los agregados celulares es uno de los factores más importantes para la regeneración de suspensiones celulares de *Oriza sativa* L.
En el marco de este trabajo hemos observado que la densidad de inoculación es un parámetro primordial por determinar para una producción óptima de embriones somáticos de cafeto.

Genotipo

La regeneración de plantas a partir de los cultivos celulares fue mencionada como dependiente del genotipo para varias especies como *Medicago* sp (Brown y Atanassov, 1985), *Glcilne max* L. (Parrot *et al.*, 1989), *Pisum sativum* L. (Kysely y Jacobsen, 1990), *Brassica oleracea* (Phippen y Ockendon, 1990) y *Vitis vinifera* (Rajasekaran y Mullins, 1983).
Meijer y Brown (1985) hacen informe de que de 19 genotipos de 4 subespecies de *Medicago sativa*, solamente 8 formaron embriones somáticos. Brown y Atanassov (1985) observan una variabilidad importante entre 76 cultivares de alfalfa *Medicago* sp, sometidos a prueba por su aptitud a la embriogénesis somática.
La lista de los factores citados previamente no es, claro está, exhaustiva pero refleja no obstante la diversidad de los parámetros que intervienen en la embriogénesis sornática, diversidad que demuestra la complejidad de la manifestación de la totipotencia celular.

Multiplicación vegetativa por embriogénesis somática de massa. Principio y estado de la técnica

La multiplicación de celulas embriogenas en suspensión permite una propagación de las plantas a gran escala (Ammirato, 1983).
La utilización de la embriogénesis somática en medio líquido como técnica de multiplicación necesita el dominio de diferentes pasos implicados en el procedimiento. Este procedimiento puede repartirse en 4 fases principales (Pétiard *et al.*, *1992*):

- estabelecimiento de las cepas celulares embriogenas,
- multiplicación y conservación de las cepas,
- Producción de embriones somáticos en bio-reactor,
- desarrollo de los embriones somáticos y conversión en plántulas.

Estabelecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas

El estabelecimiento de las suspensiones embriogenas comprende por lo general 2 fases: inducción de cales embriogénicos en medio semi-solido e instalación de suspensiones celulares por transferencia de estos callos en medio líquido. La primera etapa, que consiste en lograr callos, se realiza por lo general en un medio semi-solido que contiene una auxina asociada o no con una citokinina (Ammirato, 1983) para permitir la adquisición de la competencia a la embriogénesis. El genotipo, la composición del medio, las condiciones de cultivo son factores importantes para lograr cultivos embriogénicos (Ammirato, 1983; Thorpe, 1988).
En la segunda etapa, el cal embriogénico se traslada en medio líquido con una densidad de inoculación y un media especifico para cada cultivo, para conseguir una población de tejidos que pueda mantenerse mediante trasplantes regulares. (Van Boxtel y Berthouly, 1996).
El medio y las condiciones de cultivo utilizados pueden influenciar la morfologia celular y producir diferentes tipos celulares que coexisten en el cultivo. A titulo de ejemplo, los cultivos indiferenciadas de muestra de perforación están constituidos de 2 tipos celulares. El primero está constituido de células meristámaticas de pequeño tamaño, de citoplasma denso con granos de almidón. El segundo tipo correspande a células

parenquimatosas aisladas, de gran tamaño fuertemente alargadas y muy vacuolizadas. Solo el primer tipo celular es al origen de los embriones.
En ciertos casos, el tamaño de los agregados parece correlado con la capacidad embriogenica. Así, para la muestra de perforación, se inicia la embriogénesis después de selecionar agregados, cuyo tamaño esta incluido entre 50 y 100 µm. Esta fracción se conoce por ser mas embriogenica. En cambio, en *Ipomoea batatas,* los embriones se forman a partir de los agregados de tamaño superior a 180 µm.

Multiplicación y conservación de suspensiones:
La multiplicación y la conservación de suspenciones se realizan habitualmente mediante trasplante regular. La frecuencia de los trasplantes y la densidad de inoculación necesarias al mantenimiento de una cepa se determinan para cada una de ellas, En general, la frecuencia es de aproximadamente una a tres semanas.
Una limitación importante para la aplicación comercial de este procedimiento es la pérdida del potencial embriogeno observada en el transcurso de los trasplantes sucesivos (Smith y Street, 1974). La duración de mantenimiento de este potencial es diferente acorde a las especies.
Para paliar esta limitación, se deben integrar estrategias de conservación (crioconservación, disecación) en el procedimiento (Pétiard *et al.*, 1992). La técnica de crioconservación fue aplicada para las cepas embriogenas de diferentes especies coma *Picea glauca, Saccharum* sp, *Daucus carota* y *Coffea canephora.*

Producción de embriones somáticos en medio líquido
La multiplicación a gran escala implica que se domine la produción de embriones somáticos en medio líquido. La optimización de esta fase debe tomar en cuenta la tasa de multiplicación y la calidad de los embriones producidos que son factores importantes desde el punto de vista aplicada.
El desarrollo de embriones somáticos a partir de una suspensión celular se logra mediante transferencia de cierta cantidad de tejidos en un medio de expresión. Este medio se halla generalmente desprovisto o con muy baja concentración de auxina (Ammirato, 1983).
El método de cultivo más común para suspensiones es en frascos de Erlenmeyer (100 o 250 ml), método muy práctico en el marco de una optimización. No obstante, para una producción de embriones somáticos a gran escala, la utilización de bio-reactor puede resultar indispensable. Además, el bio-reactor permite medir y controlar diferentes parámetros como las concentraciones de oxigeno, de dióxido de carbono, el pH, y también una automatización más fácil del procedimiento (Pétiard *et al.*, 1992).
La utilización del bio-reactor para la producción de embriones somáticos tomó el vuelo en los últimos años pero sigue siendo todavia limitada a algunas especies. Se mencionan ensayos de factibilidad y de "scaling-up' para *Daucus carota,* para *Medicago sativa* y para Poinsettia. El número reducido de trabajos es comprensible, dado que el cultivo en bio-reactor implica en primer lugar un buen dominio de la embriogénesis somática en medio líquido pero también unos conocimientos especializados en genio bioquímico.
El paso del frasco de Erlenmeyer al bio-reactor puede producir una reducción de la eficacia de los cultivos. Así Zamarripa (1989) en un ensayo de "scaling-up" en una suspensión celular do cafeto, relata una producción de embriones en bio-reactor 20 veces inferior a la observada en frasco de Erlenmeyer. Stuart *et al.* (1987) logran en bio-reactor 1600-6600 embriones de *Medicago sativa* por gama de cales, mientras que logran 3000-20000 en frasco de Erlenmeyer.

Desarrollo de los embriones somáticos y conversión en plántulas
La última fase de este procedimiento de multiplicación es el desarrollo de los embriones en plántulas aptas al cultivo en vivero o en campo. Esta fase se desarrolla normalmente en medio semi-solido. Redenbaugh (1990) indica, que para la producción de semillas artificiales, la calidad de los embriones y su frecuencia de conversión en plántulas deben optimizarse.
Stuart *et al.* (1987) notan que la utilización de bio-reactores afecta la tasa de conversión en plántulas de los embriones. Así, la conversión de los embriones de *Medicago sativa* producidos en bio-reactor no es más que del 2 al 3 % contra el 70 al 90 % de conversión para embriones logrados en medio semi-solido.
En caso de modificarlo, el desarrollo de embriones somáticos puede provocar anormalidades ulteriores. Los autores subrayan que una de las dificultades mayores para aplicar esta técnica es el control do la calidad de los embriones.
En conclusión, cada etapa presenta problemas diferente para los cuales deben realizarse un estudio detenido y una optimización adelantada para tomar el procedimiento cualitativa y económicamente viable.

Semillas artificiales

El concepto de "semillas artificiales" implica que se utilicen embriones somáticos cubiertos con capsulas para la propagación a gran escala de los genotipos interesantes al nivel agronómico (Redenbaugh *et al.*, 1986). Una de las estrategias consiste en envolver los embriones somáticos en un gel de alginato adicionado con elementos nutritivos esenciales para asegurar la germinación de los embriones. El todo estaría protegido de la disecación por una capa protectora formada de un film de resina, soluble en agua (Redenbaugh *et al.*, 1986).

Las "semillas artificiales" permitirian por lo tanto asociar las ventajas prácticas de la semilla (resistencia, conservación) y las relacionadas con la multiplicación vegetativa del material seleccionado.

El empleo de "semillas artificiales" para a multiplicación en masa presenta no obstante ciertas limitaciones. Implica necesariamente un dominio de la embriogénesis somática que permite una alta producción de embriones de buena calidad. Ahora bien, a la fecha, muchas especies tienen una baja aptitud ya sea a la formación de embriones somáticos, ya sea a su conversión en plántulas.

La aplicación de esta tecnologia "semillas artificiales" implica por lo tanto la instrumentación de las diferentes etapas (regeneración por embriogénesis somática, "scaling-up", conservación, semillas en píldoras). Para esto, en 1987, se inició un programa de investigación que reunía las empresas Limagrain, Rhône Poulenc Agrochimie y Francereco-Nestlé, las metas eran los híbridos de tomate, los porta-semillas de muestra de perforación y el cafeto (Pétiard, comm. pers.).

Los genotipos interesantes por multiplicar mediante "semillas artificiales" serían los que presentan un alto valor genético añadido, tales como híbridos de especies hortícolas o hortelanas (tomate, melón, apio) o especies perennes (árboles forestales, frutales o tropicales) o aún individuos dando resultados particularmente buenos oriundos del cultivo *in vitro*, por ejemplo de la transformación genética (Monnier, 1988).

Inmersión temporaria

En CIRAD se ha desarrollado una nueva técnica llamada "immersion temporaria". Dicha técnica utiliza un nuevo recipiente producido por el CIRAD, y permite utilizar el medio líquido.

Con este sistema se puede producir, en el mismo recipiente, embriones aclimatables como lo ha demonstrado el Dr H.Etienne en su trabajo realizado en el CATIE y cuyos resultados serán presentados en este III Simposio.

3.3. Mejoramiento no convencional

3.3.1.Producción de haploides

Hubo algunos resultados interesantes en Portugal , Colombia y Costa Rica.Esta técnica podria ser utilizada para la creación de pantas haploides , y despues de doblar el número de cromosomas con colchicina, podriamos obtener plantas dihaploides homocigotas para las carectiristicas deseadas.Pero lastimamente no es una técnica que funciona actualmente en café , y por cuensecuencia no está utilizada en los programas de mejoramiento genético.

3.3.2. Transformación genética

Los progresos realizados en biotecnologias permiten pensar en una nueva estrategia de mejoramiento genetico:

La transformación genética

Es la incorporación de "un gene en una célula. Dicha técnica está utilizada por el momento para la resistencia contra los insectos, pero puede ser utilizado por otros problemas como la calidad.

El desarrollo de una técnica de micropropagación vegetativa, como la embriogénesis somática, ha permitido poner mas enfasis en dicha técnica.

En 1993 los investigadores de la NESTLÉ en Francia obtuvieron por la primera vez plantas de café transgenicas, utilisando *Agrobacterium rhizogenes*.

Dicha bacteria tiene la facultad de transferir en las células vegetales una parte de su ADN. En base:

- estos résultados(Nestlé)
- identificación de genes de *Bacillus thurigiensis* (trabajo de tesis desarollada en el Cirad por un estudiante de Brasil))
- el desarrollo de una técnica de embriogénesis somática

se ha iniciado un programa de cooperación entre la Nestlé y el Cirad desde 1994.

El objetivo de dicho programa es desarrollar un técnica de transformación genética para la introducción de genes de resistencia a diferentes insectos del café: minador de la hoja y la broca.

Actualmente se logrado obtener mas de 100 plantas transgénicas diferentes con genes de resistencia al minador de la hoja.

3.4.Los marcadores moleculares:

En los ultimos años el desarollo de nuevas técnicas de biologia moleculares han abierto nuevas oportunidades para el mejoramiento genético del café la utilizacion de marcadores moleculares deberan assistir y apoyar a la

seleccion.
Así y sin entrar en muchos detalles, el progreso realizado en dicha técnica deberia permitir:
- estudiar la variabilidad genética que existe en *Coffea sp*, abriendo la base genética de *Coffea arabica* , y permitiendo una mejor selecion de los padres utilizados en los cruzamientos
- estudiar y selecionar los genes de mayor importancia
- estudiar en los cruzamientos y retrocruzamientos la transferencia de los genes
- realizar una mapa genética del café
- estudiar la variabilidad de los patogenos que atacan el café
- estudiar y caracterizar los niveles de resistencia a enfermedades y plagas

3. 5. Conservación de germoplasma:
La conservación de germoplasma puede realizarse de dos manera:
- conservación de micro-plantas en medio simple sin hormonas y baja temperatura (20 grados)
- conservación en nitrogeno líquido (crioconservacion)

Estas son las dos técnicas principalmente utilizadas en la conservación do germo plasma do café.

4.POTENCIALIDADES Y PERSPECTIVAS DE LAS BIOTECNOLOGIAS EN CAFÉ:

4.1.Potencialidades:
1. Acortar el ciclo de selección para *C. arabica* mediante:
- La multiplicación conforme *in vitro* de híbridos (Fl, F2, retrocruzamientos),
- haplométodo (androgénesis).

2. Multiplicación rápida de genotipos de *C. canephora*, o la multiplicación hortícola plantea problemas (regiones do media altitud).
3. Transformación genética
- obtención de resistencias a los insectos (ejemplo: utilización de genes de *Bacillus*
- obtención de plantas masculinas-estériles (para producción de semillas Fl do *C.. arabica* y
- obtención de resistencia a los herbicidas.

4.2.Perspectivas
Cual es el futuro do las biotecnologias?Eso depende exclusivamente de la decisión de cada país. Pero hay que tener en cuenta actualmente , que son técnica importantes para el desarrollop de la agricultura do mañana en general, y de la cafeicultura en particular.
Por eso hay que saber:
- que la bioteonologia una técnica al servicio del investigador o del fitomejorador: eso significa que si no hay cambio en las estrategias do mejoramiento no hay interés en las biotecnologias
- que con la transformación genética es un nuevo concepto del mejoramiento, y que tanto el investigador de mañana , como el "publico" debe ser preparados
- que las biotecnologias no van a resolver todos los problemas de la agricultura
- que debido a estas nuevas tecnologias existe várias peguntas tanto al nível nacional como internacional:

Que tipo de técnica? Que legislaciones o reglas? Que tipo de plantas transgenicas?

5. CONCLUSION

Hoy dia, las biotecnologías hacen parte entera de la agricultura moderna.
Al início del secundo "milenario", hablar de investigaciones agronómicas sin hablar de biotecnologia, parece inconcebible, porque es cierto que dicha tecnologia abre nuevas expectativas.
En el caso de la cafeicultura moderna, el uso de la biotecnologia deberia permitir:
- responder mas rápidamente a los problemas planteados por los productores acortando, por ejemplo, el ciclo de selección de nuevas variedades (híbridos F1 despues 10 años),
- multiplicar masivamente genótipos seleccionados por embriogénesis somática (variedad nemaya),
- abrir nuevas estrategias de mejoramiento genético, por transformación genética (resistencia al minador de la hoja, o la broca).

Pero, es muy importante tomar en cuenta:
- que dichas "herramientas biotecnologicas" pueden ser utilizadas solamente si hay un real cambio de mentalidad en la estrategia de investigaciones,
- que la biotecnologia no va a resolver todos los problemas, pero viene y debe ser considerada como un apoyo a las investigaciones.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACUNA J. R., DE PENA M., 1991. Plant regeneration from of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. *Plant Cell Reports*, **10**:345-348.
AMEHA M., 1983. Heterosis in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease. I. First bearing stage. *Acta Horlicultural*, **140**:155-161.
AMMIRATO P. V., 1977. Hormonal control of

somatic embryo development from cultured cells of caraway : Interactions of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiol.*, **59**:*579-586.*

AMMIRATO P. V., 1983. Embryogenesis. In : *Handbook of Plant Cell Culture:* Techniques for propagation and Breeding. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato el Y. Yamada, eds., Macmillan Publishing Compagny, New York, **1**: 82-123.

AMMIRATO P.V., 1987. Organized events during somatic embryogenesis. In: *Plant Biology Plant Tissue and Cell Culture,* C.E. Green, D.A. Somers, W.P. hackett, D,D. Biesboer, ed. New York, Alan R. Liss, Inc., **3**:57-81.

ARMSTRONG C. L., GREEN C. E., *1985.* Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta,* **164**:207-214.

ASCANIO E. C. E., ARCIA M. M. A., 1987. Haploids from anther culture in *Coffea arabica* L. In : *International Congress de Plant Tissue Culture, Tropical Species;* (Bogota, 21-25 Sept.) Abstact p.68

BERTHAUD J. ,1985 Propositions pour une nouvelle strategie d'améliorationdes caféiers de l'espècie *C.canephora*, basée sur les résultats de l'analyse des populations sylvestres. In: 1 lième Colloque Scientifique International sur le Café (Lomé, 11-15 février) ASIC:Paris *445-452.*

BERTHOULY M. y MICHAUX-FERRIERE, 1996.High frequency somatic embryogenesis In.: *Coffea canephora:* Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **44**:169-176

BERTHOULY M., GUZMAN N., CHATELET P., 1987. Micropropagation *in vitro* de différentes ligneés de *Coffea arabica* V. catimor. In.: 12ème *Colloque Scientifique International sur le Café* (Montreux, 29 juin-3 juillet), ASIC, Paris, p. 462-467.

BETTENCOURT A. X. J., 1982. Variedades de café arabica resistentes a la roya y perspectivas para su utilización en la caficultura del futuro. In : *V Simposio Latinoamericano sobre caficultura* (San Salvador, El Salvador) ; IICA, traducción del portugués por J.J. Echeverri, 2O p.

BETTENCOURT A. J., 1983. Características agronômicas de seleções derivadas de cruzamentos entre híbrido de Timor e as variedades Caturra, Villa, Sarchi e catuai. In.: *Simposio sobre Ferrugens do Cafeeiro* (Oeiras, 17-20 Octobre), Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras : 353-373.

BETTENCOURT A. J., RODRIGUES C. J. J. R., 1988. Principes and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. Chapter 6. In.: *Coffee Agronomy,* R.J. Clarke, R Macrae, eds., Elsevier Applied Science Publishers LTD, England, **4**:199-234.

BOUHARMONT P., AWEMO J., 1979. La selection végétative du caféier robusta au Cameroun.*Café Cacao Thé* , **23**:227-237.

BROWN D. C. W., ATANASSOW A., 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago. Plant Cell Tissue Organ Culture,* **4**:111. 112.

CAMBRONY H. R., 1989. Le caféier. In : *Le Technicien d'Agriculture Tropicale.* Maisonneuve et Larose et A.C.C.T., 166 p.

CAPOT J., 1972. L` amélioration du caféier en Côte d`Ivoire : les hybrides 'arabusta'. *Café Cacao Thé,* **16** (1):3-18.

CAPOT J.,1975. Obtention et perspectives d'un nouvel hybride de caféier en Côte d'Ivoire L'Arabusta. In: 7*ème Colloque Scientifique International sur le Café* (Hambourg, Allemagne, 9-14 juin), ASIC, Brême, 449-457.

CARVALHO A., 1982. Melhoramento do cafeeiro cruzarnentos entre *C. arabica* e *C. canephora.* In.: 10*ème Colloque Scientifique International sur le Café* (Salvador-Bahla, 11-14octobre), ASIC, Paris 363-368.

CARVALHO A., 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica.* Chapter 4. In: *Coffee ; Agronomy.* R.J. Clarke, R. Macrae, eds., Elsevier Applied Science Publishers LTD England, **4**:129-160.

CHARRIER A., 1977. La structure génétique du genre *Coffea*; ses conséquences pour l'amélioration des caféiers cultivés. In *: 8ème Colloque Scientifique International sur le Café* (Abidjan, 28 novembre - 3 decembre), ASIC, Paris, *399-405.*

CHARRIER A., 1980. La conservation des ressources génétiques du genre *Coffea. (Café Cacao Thé* , **24** (4):249-256.

CHARRIER A., 1985. Progrès et perspectives de l'amelioration génétique des caféiers. In.: *11ème Colloque Scienfique International sur le Café,* (Lomé, 11-15 février), ASIC, Paris 403-425.

CHARRIER A., BERTHAUD J., 1988. Principles and methods in coffee plant breeding: *Coffea canephora* Pierre. Chapter *5.* In : *Coffee: Agronomy.* R.J. Clarke, R. Macrae, eds., Elsevier Applied Selence Publishers LTD, England, **4**:167-195.

COSTE R., 1968. Le caféier. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris, 310 p.

COUTURON E., BERTHAUD J., 1979. Le greffage dembryons de caféiers. *Café Cacao Thé,* **23**(4):267-270.

CUSTERS J. B. M., 1980. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: *9ème*

Colloque Scientifique International sur le Café (Londres, 16-20 juin), ASIC, Paris, 589-596.

DE GARCÍA E., MENÉNDEZ A., 1987. Embriogénesis somatica a partir de explantes foliares del cafeto "catimor". *Café Cacao Thé,* **31**(1):15-22.

DE PENA M., 1983. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica.* In : *Simposio sobre Ferrugens do Caffeeiro* (Oeiras, 17-20 octobre), Centre de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal, 494-512.

DUBLIN P., 1980. Multiplication végétative *in vitro* de l'arabusta. *Café Cacao Thé,* **24**(4):281-289.

DUBLIN P., 1982. Culture de tissue et amélioration génétique des caféiers cultivés. In : 10*ème Colloque Scientifique International sur le Café* (Salvador-Bahia, 11-14 octobre), ASIC, Paris, 433-459.

DUBLIN P., 1984. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé,* **28**(4):231-244.

ESKES A. B.,1983. Characterization of incomplete resistence to *Hemileia vastatrix* in *Coffea canephora* cv. Kouillou. *Euphytica,* **32**:632-648.

ESKES A. B., 1991. Compte-rendu de mission, Instituto Agronômico Campinas, SP, Brasil (8-18 janvier), IRCC/CIRAD, Montpellier, France, 5p.

FINER J. J., NAGASAWA A., 1988. Development os an embryogenic suspension culture of soybean *(Glcilne max* Merill.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* **15** :125.136.

FUJIMURA T., KOMAMINE A., 1975. Effets of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Science Letters,* **5**:359-364.

HALPERIN W., 1967. Population density effects on embryogenesis in carrot-cell cultures. *Experimental Cell Research,* **48**:170-173.

HARI V., 1980. Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. *Z. pflanzenphysiol.,* **96**:227.23 1.

HERMAN E. B., HAAS G. J.,1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience,* **10**(6):588-589.

KYSELY W., JACOBSEN H. J., 1990. Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* **20**:7-14.

LOUARN I., 1987. Possibilités d'amélioration de l'espèce cultivé *Coffea canephora* Pierre par hybridation inter spécifique avec les caféiers africains diploides données cytogénétiques sur les hybrides F1. In: *l2ème Colloque Scientifique Internacional sur le Café* (Montreux 29 juin - 3 juillet), ASIC, Paris, 441-452.

MEIJER E. G. M., BROWN C. W., 1985, Screening of diploid *Medicago sativa* germplasm for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports,* **4**:285-288.

MONNIER M.,1988. Embryogenèse zygotique et somatique. In *Cultures de Cellules, Tissus et Organes Végétaux, Fondements Théoriques a Utilisations Pratiques,* J. P. Zryd, ed., Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 119-134.

OZAWA K,, KOMAMINE A., 1989. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice *(Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.,* 77:205-211.

PARROT W. A., WILLLAMS E. G., HILDEBRAND D. F., COLLINS G. B., 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* **16**:15-21.

PÉTIARD V., COURTOIS D., MASSERET B., DELAUNAY P., FLORIN B., 1987. Existing limitations and potential applications of plant cell cultures. In.: *Proceedings 4th European Congress on Biotechnology* (Amsterdam), O.M. Neylssl, R.R. Van der Meer, K.C.A.M. Lyuben, eds, Elsevier Science Publisher B.V., 157-169.

PHIPPEN C., OCKENDON D. J., 1990. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers *(Brassica oleracea* var. botrytis). *Theor. Appl. Genet.,* **79**:33-38.

PIERSON E. S., VAN LAMMEREN A. A. M., SCHEL J. H. N., STARITSKY G., 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora. Protoplasma,* **115**:208-216.

RAJASEKARAN K., MULLINS M. G., 1983. Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevines. *Agronomy,* **3** (3):233-238.

RANCH J. P., OGLESBY L., ZIELINSKI A. C., 1985. Plant regeneration from embryoderived cultures of soybeans. *In vitro* Cellular and Developmental Biology, **21**:653-658.

RANGASWAMY N. S., 1986. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. *Proc. Indian Acad. Sci.* (Plant Sci.), **96**(4):247-271.

REDENBAUGH K., 1990. Application of artificial seed to tropical crops. *HortScience,* **25**(3):251-255.

SHARP W. R., CALDAS L. S., CROCOMO O. J., MONACO L. C., CARVALHO A., 1973.Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis.

Phyton, **31**(2):67-74.

SMITH S. M., STREET H. E., 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot *(Daucus carota L.)* are serially subcultured. *Ann. Bot*, **38**:223-241.

SONDAHL M. R., SHARP W. R., 1977. High ftequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.. Z. *Pflanzenphysiol. Rd.*, S. **81**:395-408.

SPIRAL J., PÉTIARD V., 1991. Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In.: 14ème *Colloque Scientifique International sur le Café* (San Francisco, 14-19 juillet), ASIC, Paris, 383-391.

SRINIVASAN C. S., VISHVESHWARA S., 1978. Heterosis and stability for yield in arabica coffee. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, **38**(3):416-420.

STARITSKY G., 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neerl.*, **19**(4):509-514.

STARITSKY G., VAN HASSELT G. A. M., 1980. The synchronised mass propagation of *coffea canephora in vitro.* In *9ème Colloque International sur le Café* (Londres, 16-20 Juin), ASIC, Paris, 597-602.

STEWARD F. C., MAPES M. O., MEARS K, 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, **45**:704-708.

STUART D. A., STRICKLAND S. G., WALKER K. A., 1987. Bioreactor of alfala somatic embryos. *HortScience*, **22**(5):800-803.

THORPE T. A., 1988. *In vitro* somatic embryogenesis. *ISI Atlas of Science Animal and Plant Science*, 81-88.

TISSERAT B., MURASHIGE T., 1977a. Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators. *In vitro*, **13**(11):799-805.

TISSERAT B., ESAN E. B., MURASHIGE T., 1979. Somatic embryogenesis in Angiosperms. *In Horticultural reviews.* J. Janick, eds, AVI Publishing, Westport, Conn., **1**:1-78.

VAN BOXTEL J. y BERTHOULY M. 1996.High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves:Factors influenelng embryogenesis, and subsequent and regeneraction in liquid medium.*Plant Cell, Tissue and organ Culture*, **44**:7-17

VAN DER VOSSEN H. A. M., WALYARO D. .J., 1980. Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* II. Inheritance of the resistance. *Euphytica*, **29**:777-791.

VAN DER VOSSEN H. A. M., WALYARO D. .J., 1981. The coffee breeding programme in Kenya a review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. *KenyaCoffee*, **46**(541):113-130.

YASUDA T., FUJI Y., YAMAGUCHI T., 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell. Physiol.*, **26**(3):595-597.

ZAMARRIPA A.,1986. Selección preliminar de 13 progenies avanzadas de *Coffea arabica* L. 'Catimor' con resistencia a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. en Rosario Izapa, Chiapas. *Tesis de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista*, Universidad Autónoma de Chiapas, Villaflores, Chiapas, México, 124 p.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE

M. Berthouly And H. Etienne

1. INTRODUCTION

1.1. Importance of coffee worldwide

Coffee is one of the most important agricultural products on the world market, and is the most widely grown tropical tree crop. Various Latin American countries such as Colombia, Brazil and Central America depend heavily on coffee production for foreign currency earnings. More generally, the economies of 50 countries depend on this crop, which is grown on 11.2 x 10^6 ha and which produced 5.3 x 10^6 tons of green coffee in 1992 (Café Cacao Thé, 1992) and 5,603 metric tons during 1995 (FAO 1995).The coffee consumed worldwide primarily comes from two cultivated species: *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, which account for 75 and 25% of the world market, respectively. The coffees produced by the two species are commercially known as "arabica" and "robusta".

C. arabica is grown in high-altitude tropical regions (500 to 2 500 meters). It is the only tetraploid (2n = 44 chromosomes) and autogamous species of the *Coffea* genus. *C. arabica* is well suited to high-altitude regions, and produces high quality coffee with a low caffeine content. However, this species is susceptible to main diseases such as leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) and coffee berry disease (*Colletotrichum coffeanum* (CBD).

C. canephora is a diploid (2n = 22 chromosomes), allogamous species that produces coffee with a higher caffeine content, which is poor in quality as compared to the quality of C.arabica. It is grown in low-altitude tropical regions (0 - 100 m). With respect to genetic improvement, it is a very worthwhile source of genes for resistance to rust, CBD and nematodes (Bettencourt and Rodrigues, 1988). Given its allogamy, the *C. canephora* species comprises genetically heterogeneous individuals. The progenies of cross fertilization, therefore, have a substantial genetic variability.

In general, *C. arabica* is more susceptible to disease than *C. canephora*. This is due to the genetic base and greater variability of the latter, given its allogamy.

Two major fungal diseases affect coffee plants which are leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* and coffee berry disease (CBD), caused by *Colletotrichum coffeanum*. Other pathogens such as *Rhizoctonia*, *Fusarium* can also affect coffee trees (Haarer 19 The word "pest" can have a very broad meaning, ranging from insects to nematodes via weeds (Haarer 1989).

In our case, we shall quote just two main pests that currently cause significant damage in plantations: the coffee berry borer (CBB, *Hypothenemus hampei*) and nematodes (root parasites).

There seems to be no natural resistance to the CBB, and therefore, possible genetic transformation is the only possible solution.

In the case of nematodes, although this approach could be considered, there is a degree of natural resistance to certain types, notably in species such as *C. canephora*. Nematodes are of deep concern worldwide in *C. arabica*.

1.2. Conventional protocols for improvement of coffee

The *C. arabica* breeding method is applied to autogamous species. It is based on producing pure lines by pedigree selection after recombining parental characters brought by the parents.

Heterosis has been reported in *C. arabica* in India (Srinivasan and Vishveshwara 1978), Kenya (Van der Vossen and Walyaro 1981) and Ethiopia (Ameha 1983), and more recently in Costa Rica (Bertrand *et al.* 1997). Trials of vegetatively propagated F1 hybrids proved unsuccessful, as the conventional propagation methods resulted in poor multiplication rates (Van der Vossen 1985).

There are generally two ways of breeding *C. canephora* (Bouharmont and Awemo 1979; Charrier 1985): a) by seeds ; which produce heterogeneous populations, and b) vegetatively, which can be summed up as the choice of two clones with the desirable characters. The selected trees are then vegetatively propagated. Polyclonal plantings are necessary to ensure cross-fertilization.

Generally, only *C. arabica* is distributed or sold in seed form after a relatively long pedigree selection process (almost 30 to 35 years) .This process produces stable and homozygous lines with desirable characters. Once the variety is obtained, it is sufficient to establish a seed garden to produce seeds genetically identical to the mother plant, since the plant is autogamous.

Until now, varietal propagation of C.canephora was done by vegetative means to benefit from the higher productivity of clones in relation to varieties grown from seeds (Capot, 1975) and from the heterozygosity of the plant.

In recent decades, given the complementary

characteristics of *C. arabica* and *C. canephora* (quality of the first one and disease resistance of the later), breeding has been greatly appreciated in creating interspecific hybrids (Icatu). These hybrids are multiplied asexually.

Vegetative propagation, therefore, plays an important role in coffee breeding. It enables the propagation and exploitation of heterozygous genetic material. It can also reduce the number of breeding cycles. In fact, with coffee, a perennial crop, it takes at least 35 years to develop a variety. Thus vegetative propagation can be applied to selected *C. canephora* clones, interspecific hybrids such as arabusta, or *C. arabica* intraspecific hybrids such as Ruiru 11.

Cuttings are the most commonly used vegetative propagation procedure in coffee. However, given the dimorphism of the vegetative axes, the number of orthotopic cuttings that a coffee tree can produce is extremely limited. For large-scale multiplication, the avaibility of limited number of cuttings can be time consuming . Moreover, horticultural cuttings call for propagation plots, which involve various constraints such as upkeep and required land area (Deuss and Descroix, 1984).

1.3. Need for new mass propagation techniques

Over the past several years, the progress made in biotechnology (micropropagation, molecular biology) has opened up new prospects for research programmes. In this context, the development of in vitro multiplication techniques is extremely useful for increasing the multiplication rate enabling the rapid distribution of the hybrids and clones produced.In the past few years, several authors (Staritsky 1970; Söndahl and Sharp 1977; Dublin 1980, 1982; Pierson et al., 1983; Yasuda *et al.* 1985; de Garcia and Menendez 1987; Berthouly *et al.* 1987) have shown that microcutting and somatic embryogenesis can be applied to coffee.

Somatic embryogenesis appears to be an inexpensive alternative for multiplying selected plants. In addition to providing a worthwhile model for fundamental studies, its most promising application is in large-scale plant propagation (Ammirato, 1977). Various studies on coffee have revealed the suitability of the species for somatic embryogenesis and for embryo development into plantlets. However, the multiplication rate is still very low for its large-scale use. In fact, de Garcia and Menendez (1987) working on coffee somatic embryogenesis on a solid medium, reported 60 to 65 somatic embryos per explant after 14 weeks' culturing as a record figure.

To exploit the substantial potential of somatic embryogenesis, it is necessary to use a liquid medium and hence, cost of plantlet production can be reduced . Indeed, by culturing cell suspensions, mass embryo production can be scaled up in a bioreactor. The results obtained with other species are highly promising. Pétiard *et al.* (1987) reported a production capacity of 80 000 carrot embryos per litre per day in a ten-litre bioreactor.Currently, there is no in vitro propagation methods available for commercial coffee production.

2. MICROPROPAGATION BY SOMATIC EMBRYOGENESIS

2.1. Introduction

2.1.1. Background To Coffee Somatic Embryogenesis

Somatic embryogenesis has been widely used for many years for micropropagation of both herbaceous and woody plants(Jain and al 1995). It has been tested on different types of tissue (leaves, stems, embryos, etc.). In several *Coffea* species and genotypes, somatic embryogenesis is well documented (Staritsky 1970; Söndhal and Sharp 1977; Pierson *et al.* 1983; Dublin 1984; Yasuda *et al.* 1985; Berthouly and Michaux-Ferrière 1996)

2.1.2. Different Types Of Somatic Embryogenesis

Since the first work by Staritsky(1970), two types of somatic embryogenesis have generally been described by Söndhal(1970):

a)"low frequency": the somatics embryos are obtained on only one medium without producing calli. Quite often a small number of somatic embryos (a few to 100 per explant).

b) "high frequency using two medium" : at induction medium for primary callogenesis, and a secondary regeneration medium to produce embryogenic friable calli comprised of solely embryogenic cells producing several hundred thousand of somatic embryos per gramm of callus, but also the use of a liquid medium for the regeneration phase.

2.1.3. Prospects For Somatic Embryogenesis In Coffee

There are three main reasons for using somatic embryogenesis in coffee:

a) to shorten the *C. arabica* breeding cycle by true-to-type micropropagation of hybrids (F1, F2, backcrosses) ;

b) raid multiplication of *C. canephora*, genotypes having multiplication problems (medium-altitude regions);

c) as vehicle for genetic transformation.

2.2. Induction of embryogenic calli

2.2.1. Material And Methods

Leaves were collected from the selected mother plants in the field. All samples were disinfected by immersion in 10% calcium hypochlorite solution containing 1% Tween 80 for 20 min followed by 8% calcium hypochlorite solution for 10 min and rinsed 4 times with sterile water. In this case we present information on high frequency somatic embryogenesis which is more viable for mass propagation.

Explants (1 cm^2) were cut without the main vein, and placed on a initial basal medium containing half-strength Murashige and Skoog (1962) salts, 88mM sucrose, 100 $mg.l^{-1}$ casein hydrolysate, 400 mgl^{-1} malt extract, 10mgl^{-1} thiamine, 1mgl^{-1} nicotinic acid, 1mgl^{-1} pyridoxine, 1 mgl^{-1} glycine, 100 mgl^{-1} myoinositol, 2.2 µM 2,4 D, 2,4 µM IBA and 9.8 µM 2iP, solidified with gelrite (2 $gl-^{1}$) in glass tubes or small petri dishes. The pH was adjusted to 5.6 before autoclaving. The cultures were incubated at 25 °C + 1 in darkness.

After 4 weeks, explants with a callus were transferred to a second medium to promote high a frequency rate of embryogenic callus formation. The second basal medium was unlike the first basal medium in that it contained 200 mgl-1 casein hydrolysate, 800 mg malt extract, 20 $mgl\cdot^{-1}$ thiamine, 20 mgl^{-1} glycine and 200 $mg.l^{-1}$ myoinositol. Pyridoxine and nicotinic acid were omitted. This medium also contained 40 mgl-1 cysteine and 60 $mgl-^{1}$ adenine sulphate. The cultures were incubated at 26°C + 1 on shelves without light.

After 10-12 weeks of culture on this second medium we obtained yellow friable embryogenic calli. This calli were transferred to either solid or liquid media to proliferate or regenerate somatic embryos.

2.2.2. Optimum Conditions For High Frequency Embryogenic Calli

Different concentrations of plant growth regulator were used in the two successive culture media and during subculture on the first medium. The effect of temperature was also tested.

As shown in table 1, the percentages of high frequency embryogenic calli were dependant upon the age of the culture on the first medium and varied from 0 to 100 according to the different auxin-cytokinin ratios in the medium.

The X^2 test at 5% level showed that the percentages of high frequency embryogenic calli were significantly higher when first culture had grown for 4 weeks (87 %) as compared to a first culture grown only 3 weeks (78 %). When the friable calli were obtained from explants on the second medium with only BAP(6Benzyl aminopyrine), they contained very small globular embryos (~100µM in diameter). The absence of 2,4-D(2,4 dichlorophenoxy acetic acid) in the medium may explain the rapid development of embryogenic cells of the calli into globular embryos. Keeping 2,4D in a maintenance medium is very important to maintain strong regeneration capacity and inhibit globular embryo formation.

2.2.4. Genotypic Effect

A genotypic effect on embryogenic explant production has been seen in many plants, and coffee is no exception (Berthouly and Michaux-Ferriere 1996; Van Boxtel and Berthouly 1996). For Coffea *canephora* the percentages of highly embryogenic calli from different genotypes varied from 21 to 98 % on first medium containing 2,2 µM 2,4 D, 4,9 µM IBA, and 9,8 µM 2iP, and from 55 to 100 % when the first culture medium was supplemented with 2,2 µM 2,4 D, 2,4 µM IBA, and 9,8 µM 2 iP(6- y-y-dimethylallyamino purine) (table 2).

This variability in obtaining embryogenic calli depends on the genotypes used and has also been observed in *Coffea arabica*, in both varieties and hybrids (table 3)

Although genotypic effect is observed in both *C. arabica* and *C. canephora*, it is possible to obtain embryogenic calli irrespective of the genotype, more importantly with fairly high response levels. This characteristic makes coffee a plant that as it respond well to somatic embryogenesis. Either no or poor response of certain genotypes has been reported for most species, and this is one of the main obstacles to the routine use of this techniques in breeding or mass production schemes.

TABLE 1. Highly embryogenic calli (%) of *Coffea canephora* obtained after 3 or 4 weeks on initial basal medium for conditioning and 10 weeks on a second medium according to PGR ratios

PGR concentrations in the first medium (μM)	Culture age (weeks)	High frequency embryogenic calli (%)			
		PGR concentration in the second medium (μM)			
2,4-D IBA 2iP		2,4-D BA	4.4 35.6	4.4 17.8	0 17.8
2.2 2.4 9.8	3		83b	100a	100a
	4		100a	100a	100a
2.2 4.9 9.8	3		100a	100a	100a
	4		100a	8b	63de
4.4 2.4 9.8	3		0g	40f	100a
	4		75bc	71cd	60e
4.4 4.9 9.8	3		80b	100a	33f
	4		100a	100a	92a

Number of explants for each experiment=150.Data followed by the same letter are not significantly different at 5% level (X^2 test). (pgr = plant growth regulateur)

2.2.5. Seasonal Effect

In addition to the "genotypic effect", there is also a "seasonal effect" in coffee: embryogenic callus can depend on the collection time of explant from the mother plant in the field.

For example, culturing two genotypes of *Coffea canephora* using the same medium, the percentages of high frequency embryogenic of calli was obtained, varying from 60 to 100 % depending on time of the year (table 4) under the similar climatic and soil conditions. Seasonal conditions can influence both percentage of embryogenic explants, as well as the quantity of callus produced per explant. Climatic conditions directly affect contamination levels after transfer *in vitro*. It is obvious preferable to collect vegetal material in dry weather.

Lastly, it is important to note that the quantity of calli produced per explant depends on the genotype and culture conditions (Tables 2 and 3).

Table 2. Highly embryogenic calli (%) obtained on the second induction medium (basal medium + 4,4 μM 2,4-D + 17,8 μM BA) according to genotype and to the population of PGR in the first conditioning medium

GENOTYPES	High frequency embryogenic calli (%)	
	PGR 1st conditioning medium (μM) 2.2 2,4-D 2.4 IBA 9.8 2iP	PGR 1st conditioning medium (μM) 2.2 2,4-D 4.9 IBA 9.8 2iP
3554 A	96.3bc	48.7ij
3554 B	81.7de	69fg
3751 A	91.6cd	20.8sk
3751 B	100a	90d
3752 A	64.8gh	37.7j
3752 B	88.7d	98.3ab
3754 A	55hi	75.7ef
3754 B	64.9gh	65.3gh
3756 A	100a	96.3bc
3756 B	56hi	83.7de

Number of explants for each experiment= 150.Data followed by the same letter are not significantly different at 5% level (X^2 test)

Table 3. Percentage of embryogenic calli and weight of embryogenic calli obtained from different *C. arabica* F1 hybrid families

C. arabica Hybrids	N° of explants Introduced	% embryogenic explants (EC)	Weight of embryogenic calli per explant (ECP mg)
Family 1/hybrid 1	642	38c	282a
Family 2/hybrid 1	504	6d	72b
Family 2/hybrid 2	641	24cd	179a
Family 3/hybrid 1	866	42bc	224a
Family 3/hybrid 2	623	17cd	117ab
Family 4/hybrid 1	639	52abc	262a
Family 4/hybrid 2	384	74ab	284a
Family 4/hybrid 3	385	33cd	278a
Family 4/hybrid 4	382	32cd	211a
Family 4/hybrid 5	285	79a	325a

The statistical analyses were carried out on transformed values: ArcsinVce and log (ECP +1)

Table 4. Highly embryogenic calli (%) obtained from leaf explants of 2 *Coffee canephora* genotypes collected throughout the year and cultured 4 weeks on the first medium (2,2 µM 2,4-D + 2,4 µM IBA + 9,8 µM 2iP) and second medium (4,4 µM 2,4-D + 17,8 µM BA)

Month	Genotype 3751 A	Genotype 3751 B
January	65efg	60g
February	62fg	63efg
April	100[a]	98[a]
May	100[a]	100[a]
June	100[a]	88b
August	100[a]	76cd
October	73e	71def
November	88b	83cd

The same results were obtained with *Coffea arabica*

2.3. Embryogenic cell suspensions

Within 3-4 months (depending on genotype) friable embryogenic calli developed on explants cultured on a solid medium. At that time a piece of calli was subcultured to the liquid medium containing half strength MS minerals, 5 mg/l thiamine-HCl, 0,5 mg/l pyridoxine-HCl, 0,5 mg/l nicotinic acid, 10 mg/l L-cysteine, 50 mg/l myo-inositol, 100 mg/l casein hydrolysate, 200 mg/l malt extract, 15 g/l sucrose, pH 5.6 and a mixture of 2,4-D(2,4 dichlorophenoxyacetic acid) and kinetin. The resulting cell suspension cultures were cultured in 250 ml Erlenmeyer flasks at 27° C on a rotary shaker at 100 rpm. Stable embryogenic cell suspension cultures were obtained at 2-3 months after initiation in a liquid medium. For subculture in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml liquid medium, only aggregates smaller than 1mm in diameter were collected using a narrow mouth pipette (Falcon).

Stable embryogenic cell suspension (histological study) cultures of several coffees species and genotypes obtained by this procedure were used for more detailed testing of liquid culture variables, including 2,4-D concentration, photosynthetic photon flux PPF, subculture interval and initial culture density.

2.3.1. Effect Of 2,4 D

Only two concentrations of 2,4-D were tested (4,5 or 9 µM). No significant dose effect was observed (Fig. 13). Thus 4.5 µM 2,4-D and 4.6 µM kinetin were chosen for further testing of other liquid media.

2.3.2. Effect Of Different Subculture Intervals

Subculture intervals of 3, 6, 14 days were tested. Less tissue proliferation was observed when subcultured at 3-day intervals rather than 6 or 14-day intervals (Fig. 14). No difference was observed between the 6 and 14-day subculture intervals. To minimize culture handling without adversely influencing cell suspension growth, a 14-day subculture interval was regularly used for rapid growth of tissue.

2.3.3. Effect Of Culture Density

Cell suspension cultures were subcultured without readjustment to their initial density. Figure 15 shows *C. canephora* growth in relation to different initial inoculum densities.

Growth of cell suspensions 20 g l^{-1} and 10 g l^{-1}

culture density slowed down between 6 and 8 weeks. In 0.5 g l^{-1} culture density and to a lesser extent in 2 g l^{-1} cell culture density, somatic embryos were observed, no somatic embryos formed in embryogenic cell cultures with cell density 5, 10 and 20 g l^{-1}. Thus a minimum culture density seemed to be necessary to avoid somatic embryo formation. Calculation of the multiplication rate (MR) demonstrated the exponential growth during the first week of culture for each density tested. During the second week, the MR of all cultures decreased to a level between 1.0 and 1.8(en gr/l en freh mater), when during the first week it was between 3 and 15 in relation with the density(en gr/l en freh mater).

Thus, by culturing small amounts of embryogenic callus at a density of 5 g l^{-1}, a relatively low MR can be maintained over several weeks. Under these conditions, subculturing in order to avoid a growth plateau is less often necessary.

When cultures had been subcultured weekly with readjustment to their initial density of 10, 15, or 20 g l^{-1}, the MR over 4 week culture period was 2.0, 1.8, and 1.5, respectively. The MR of 10 g l^{-1} cultures was significantly higher than the MR of 20 g l^{-1} cultures. Thus, weekly readjustment of culture density to 10 g calli l^{-1} can be to used accelerate growth of cell suspension cultures.

2.3.4. Nutrient Evolution In The Medium

Absorption of some macro- and micro-salts by embryogenic cell suspensions was monitored by regularly analyzing the used amount of nutrients in the culture medium. After 12 days of culture, 60 - 70% of the initial concentration of nutrients was still present (Fig. 16).

After 3 weeks, macro-salts and nitrogen sources had decreased by 50-70%, and in which the amount of available magnesium was the lowest (30% of initial concentration). These results suggest that amount of MS macro- and micro-minerals at half strength in the culture medium do not deplate in coffee embryogenic cell suspension culture for at least 3 weeks of culture.

In trying to optimize long-term maintenance of embryogenic cultures, instead of subculturing in a completely fresh medium every 2 weeks, a part of the embryogenic callus was discarded and concentrated nutrients were added to the conditioned culture. In all cases, growth was nevertheless inhibited after 2 months of culture. Therefore, medium renewal remains necessary at regular time intervals in order to sustain the growth of embryogenic suspensions, presumably by eliminating growth-inhibiting substances present in the conditioned medium.

2.4. Regeneration in a liquid medium

2.4.1. Systems Used

Somatic embryogenesis, using liquid media, whether for cell suspensions in Ermlenmeyer flasks or in bioreactors, is limited to the quantity embryogenic to somatic embryos produced, and these embryos have to be transferred to a gel medium several times to ensure their development into plantlets. However, these operations are extremely costly, as they are labour-intensive in terms of both the individual selection/handling of embryos and gel culture medium production.

Using a liquid medium for embryo production provide substantial guarantees to improve productivity. As it enables the automation of liquid culture methods and reduce the cost as compared to solid medium.

Using a liquid medium for embryo production/or plant procedure and combining the multiplication of embryogenic aggregates in Erlenmeyer flasks make such a technology applicable on an industrial scale. A temporary immersion system has been developed at CIRAD, on different plants, and is now being applied on a large scale for coffee. The principle behind it and the conditions for its use are described in section 3[2].

However, as seen previously, once embryogenic calli are obtained and suspension cell cultures are established, regeneration is possible in the liquid medium according to conventional procedures. The efficacy of regeneration largely depends on certain parameters such as cytokinin levels and the initial quantity of fresh matter.

2.4.2. Effect Of Ba And Inoculum Density

Figure 17 shows the combined effect of benzyladenine (BA) and inoculum density on globular somatic embryo formation, and the increase in calli fresh weight in the regeneration medium. Globular somatic embryo formation was inversely related to inoculum density and the earliest abundant somatic embryo formation was mostly observed with an inoculum density of 1g l^{-1} and f4.4 µM or 17.6 µM BA.

Zamarripa (1993) reported the presence of certain substances that were inhibiting to somatic embryogenesis in coffee calli cultured at high density. Adding of BA in the culture medium appeared to neutralize the influence of inhibitory substances and allowed for somatic embryo formation.

3. DEVELOPMENT OF A NEW CULTURE SYSTEM(*Temporary immersion system*) TO IMPROVE SOMATIC EMBRYOGENESIS

A new temporary immersion system, known as RITA (*Automatic Temporary Immersion System*), has been developed at CIRAD over the past eight years (Alvard *et al.* 1993; Teisson and Alvard 1994; Berthouly *et al.* 1995; Etienne *et al.* 1997 b) to avoid transfer to a solid medium during the final stages of somatic embryogenesis, i.e. embryo development, germination and conversion into acclimatizable plants. The device has already proved its efficacy, i.e. its superiority to semi-solid media for producing microcuttings of coffee, banana and *Hevea*, and for somatic embryogenesis on coffee (Berthouly *et al.* 1995; Etienne *et al.* 1997 a), banana (Alvard *et al.* 1993), *Hevea* (Etienne *et al.* 1997 b) and citrus species (Teisson and Alvard 1994), and lastly for producing potato microtubers.

3.1. Operation

In the beginning, the device used for the initial experiments was a readily available, autoclavable filter unit, modified by linking the upper and lower compartments by a glass tube. The Biotrop *in vitro* culture laboratory (CIRAD) has now developed a small, economical device that is easy and above all, flexible to use. The unit is operated in the opposite way to filtration units in general: the plant material is placed in the upper part and the liquid medium at the bottom (Fig. 18).

When the lower compartment is pressurized, using a small laboratory air pump, the medium is pushed up into the upper compartment. A simple timer switch is used to control the frequency and duration of pump operation, hence of immersion. When the pressure is released, the liquid naturally flows back down again. The air blown around the container throughout the immersion period renews the internal atmosphere. All the air flows are sterilized by 0.2µ hydrophobic vents.Each system is therefore independent and can be moved individually.

3.2. Advantages of the system

This container has the same advantages as bioreactors, without the following two types of limitations:

- Physiological limitations: permanent contact with the culture medium results invitrification and constant movement of the plant material, that prevent the establishment of polarity and hinders somatic embryo development, oxygenation problems.
- Technical and financial limitations: exorbitant bioreactor cost, their lack of flexibility, complicated technology and fragility in the event of power cuts where the plant material dies within a few hours due to lack of oxygen.

Currently all these drawbacks, making it impossible to use bioreactors for mass production, particularly in developing countries, are resolved with temporary immersion systems. Temporary immersion enables the development of plantlets from embryogenic cell suspension cultures. Moreover, this development "from cell to plant" takes place in the same container, without handling the plant material; it is sufficient to only change the medium. The explants are in contact with the liquid culture medium for just a few minutes per day, and the duration of contact can be adjusted to prevent any risk of vitrification. The container is ventilated naturally and passively by vents, with pulsed air during immersion to renew all the air in the container.

On a technical level, the RITA^R is small, autoclavable, easily accessible (US$ 55), portable (it can be transported easily without risk of contamination), and easy to operate. In the event of power cuts plant material is not affected .The liquid medium in the lower section is not in contact with the cultures but it maintains a high moisture level. The plant material can withstand power cuts lasting over 10 days. Another advantage for mass production is that laboratories can easily have hundreds of RITA units, hence greater flexibility than with one or two bioreactors. With RITA units, it will be easy to produce several cultivars at once and adapt production volumes to demand throughout the year.

3.2.1 Context

In somatic embryogenesis procedures aimed at mass production, the use of liquid media to produce cell suspension cultures in Erlenmeyer flasks or in bioreactors is limited to the multiplication of embryogenic clumps. These embryos have to be transferred several (at least three) times to a gel medium in these systems to ensure their development into wholly acclimatizable plants. However, these operations are extremely costly due to the substantial quantities of labour, containers, gel media and laboratory space required.

Using liquid media for as much of the process as possible is a significant guarantee of its efficacy. It should contribute substantially to reducing the cost per in vitro plantlet, an essential factor for commercial production. The originality of the somatic embryogenesis protocol presented here lies in the use of liquid culture media for the major part

of the process, i.e. to multiply embryogenic clumps in Erlenmeyer flasks and for embryos production temporary immersion is used.

3.2.2 Regeneration By Temporary Immersion

Acclimatizable germinated embryos are produced in three stages, each lasting two months:

a) Proembryo regeneration

b) Somatic embryo development

c) Germination

The whole of the regeneration phase takes place in the light, in the same container and without handling the plant material. However, the medium has to be changed at the end of each stage. Immersion frequency and density are the key factors in this stage. As for regeneration in Erlenmeyer flasks, the optimum density is 1 g of embryogenic clumps per litre of culture medium. The plant material and the medium are in contact for just 2 x 1 min/day during the regeneration and embryo development stages and 4 x 5 min/day during germination. This very limited exposure to the liquid medium rules out any risk of vitrification, since problems start to arise with immersion frequency/duration combinations of over 4 x 15 min/day.

It is possible with most genotypes to obtain very high outputs of around 12,000 somatic embryos with RITA, i.e. 60,000 embryos/g of cell suspension. All these embryos are all morphologically normal (differentiated cotyledonary embryos) and highly uniform. The conversion rate into plants on gel media is around 90%. However, for the time being, it is apparently impossible to achieve satisfactory subsequent development at such densities. The main aim - obtaining directly acclimatizable material - means working at lower densities of around 3,000 embryos per RITA. Depending on the genotype, the number of acclimatizable germinated embryos obtained per RITA can vary between 1,000 and 9,000 (Table 6). The uniformity and quality of these embryos are better than those obtained on semi-solid media.

It is, therefore possible to achieve sufficiently advanced development for the somatic embryos to acclimatize directly, with success rates already more than 50%. The conversion rate of these somatic embryos into plants *in vitro* is around 90%, which gives one an idea of the scope for improvement in regard *to ex vitro* conversion rates. As far as we know, this is the first time that direct somatic embryo conversion into plants on a horticultural substrate has been observed for a woody plant in the greenhouse.

Current research on embryo preparation for direct acclimatization via a maturation phase, and on adapting acclimatization conditions to this material without leaves lead us to hope that acclimatization rates of over 70% should soon be possible. Embryo conversion into plants can also be obtained directly in RITA^R units, provided the density does not exceed 500 somatic embryos per container. This operation is clearly pointless as compared to direct acclimatization of germinated embryos, which can be produced in much larger quantities. However, this result effectively confirms the importance of the density factor. An initial technical evaluation has been made of the merits of using temporary immersion in a liquid medium for germination and somatic embryo conversion into plants alone. The results are shown in Table 7. This study was carried out with the family one per hybrid 1 (cf. Table 6) and for the production of 9, 000 acclimatizable somatic embry.

Table 6. Performance of *C. arabica* F1 hybrids regenerated by temporary immersion. The tests of embryo conversion into plantlets each considered 200 somatic embryos. The figures quoted are the means of at least three replicates, corresponding to different containers

***C. arabica* hybrids**	**Number of somatic Embryos per RITA^R Container**	**Conversion into plantlets of embryos germinated in RITA^R units**	
		on gel medium in vitro	**On horticultural Substrate *ex Vitro***
Family 1 / hybrid 1	5 000 a	95 a	68 a
Family 2 / hybrid 1	3 809 b	85 bc	50 c
Family 2 / hybrid 2	2 678 c	89 b	61 b
Family 3 / hybrid 1	2 663 c	85 bc	45 d
Family 3 / hybrid 2	2 038 d	83 c	52 c

Table 7. Comparison of the efficacy of somatic embryo germination and conversion into plants using temporary immersion and gel media

Characteristics of embryo germination and conversion into plants	Data obtained with Temporary immersion	Data obtained with semi-solid media
Duration (weeks)	16 ± 1	16 ± 3
Culture density (N° of embryos/container)	5 000	200 (4 wks) / 40 (4 wks) / 6 (4 wks)
N° of containers	3	50 / 250 / 1670
Area taken up by containers (m^2)	0.3	0.42 / 2.1 / 14
Germination (%)	98 ± 0	97 ± 3
Embryo conversion into plants (%)	60 ± 4 (in greenhouse)	84.3 ± 5.0 (*in vitro*)
Acclimatization (%)	Ditto	95
N° of acclimatized plants	9 000	9 000
Operations for 9 000 acclimatized plants	2 changes of liquid medium + acclimatization	3 transfers to solid media + root induction + acclimatization
Plant material handling time (h)	6 (*in vitro*)	81 (*in vitro*)
	22 (acclimatization)	126 (Root induction + acclimatization)
	total: 30	total: 207

An analysis of the technical data largely favours using the temporary immersion system. It was possible to produce 9 000 acclimatizable germinated embryos using just three RITA units and 1.2 l of liquid media, whereas it took 1 670 pots, each containing 30 ml, i.e. 50 l of gel medium in all to produce the same quantity on a semi-solid medium, which cost more, given the high price of Phytagel.

A comparison of the areas used also shows that semi-solid media are less efficient than liquid media, but above all, a comparison of the work times involved proves the merits of culture in a liquid medium (30 h) in relation to the traditional system (207 h). Production times and costs, which also favour using a liquid medium, were not considered.

These results indicate that temporary immersion system should substantially reduce the cost of producing coffee plants by somatic embryogenesis. This advantage would have been even clearer without limiting to studying embryo germination and conversion into plants, although these are the most costly stages of somatic embryogenesis. The system also ensures greater productivity at the embryogenic expression and embryo development stages, with all four phases taking place in the same container. The results obtained prove that temporary immersion enables the mass propagation of *C. arabica*. It should be possible to use similar culture conditions successfully for other coffee species, but also for other woody and herbaceous species. Until now, although some authors had described the use of cell suspension or bioreactors to initiate the regeneration process, these systems had not removed the need to "plant" embryogenic clumps or young somatic embryos on a semi-solid medium to achieve their development into acclimatizable plants (Zamarripa *et al.* 1991; Neuenschwander and Baumann 1992).

4. EXAMPLES OF THE USE OF SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR COFFEE IMPROVEMENT AND MASS PROPAGATION

4.1 Mass propagation of *C. canephora* in Uganda

Uganda has had a tissue culture laboratory since 1994. Its aim is to multiply six selected *Coffea canephora* clones on a large-scale by somatic embryogenesis (Fig. 20).The laboratory has three culture chambers. Two are equipped with the temporary immersion system (800 per chamber). There are plans to produce several million coffee *in vitro* coffee plantlets by somatic embryogenesis each year.

4.2 Improvement and mass propagation of *C. arabica* and *C. canephora* in Central America

Since 1992, there has been an Arabica coffee genetic improvement project in Central America, linking PROMECAFE[1], CATIE[2] and French scientific support organizations (CIRAD[3], ORSTOM[4], and the Ministry of Foreign Affairs). The project has three components: a) study of available germplasm, b) varietal creation and c) biotechnology consisting in micropropagation

which is of crucial importance, since the improvement strategies chosen mean using *in vitro* plantlets.

In effect, varietal creation is based on creating and breeding F1 hybrids, for which the only possible large-scale multiplication method is micropropagation.

The aims of micropropagation under this project are twofold:

a) To introduce *in vitro*, multiply and distribute to project member countries improved material produced by varietal creation;

b) To develop a mass propagation method by somatic embryogenesis and transfer it to laboratories in improvement project member in countries.

4.2.1. Example Of Multiplication Of C. Canephora Parents Of The Nemaya Stock Variety

On various occasions, a hybrid between two *C. canephora* has proved highly resistant, and in some cases immune, to different nematodes, for instance *Meloidogyne* and *Pratylenchus* (Anzueto 1989, Bertrand 1995). The hybrid is T3751 (1-2) x T3561 (2-1), known as the "Nemaya variety" (F1 hybrid) amongst the researchers that described it.

Because the demand for this stock is huge, the best way of producing it on a large scale is to set up seed gardens where the two parents are grown side by side. Each tree will thus produce "Nemaya variety" seeds. As *C. canephora* is allogamous, vegetative propagation is required. Horticultural propagation is not possible as large quantities of each parent would have to be produced and there is only one individual in the CATIE collection. The number of orthotopic axes available for cuttings or buddings is, therefore, too small.

The decision was therefore, taken to multiply the two parents by tissue culture, particularly somatic embryogenesis, as the region's requirements are substantial (for instance, 7 ha of seed gardens for El Salvador or Guatemala). The ease with which the material can be introduced *in vitro* - a simple square of leaf that can easily be disinfected - was also a determining factor in favour of somatic embryogenesis. Thirty thousand plants of the two parents were produced at the CATIE laboratory in 1996-1997 and are now being distributed and acclimatized in the countries affected by nematodes, with objective of setting up seed gardens.

4.2.2. Example Of Multiplication Of *C. Arabica* F1 Hybrids Of Agronomic Worth

The Arabica coffee genetic improvement program is original in that it is based on hybridizing local varieties (Caturra, Catuai, Catimor, Sarchimor) with wild origins (Ethiopia, Sudan). The program objectives are to increase the adaptability and productivity of the varieties and improve their disease and pest resistance, while conserving good cup quality.

In vitro micropropagation techniques are the best way of rapid multiplication of selected F1 hybrids. Given its high multiplication potential and the possibility of eventually producing low-cost plants, it was decided to use somatic embryogenesis for large-scale multiplication of the best cultivars. Moreover, using this technique reduces the breeding cycle from 30 to 10 years, and makes it possible to offer growers different candidates for the wide variety of situations in Central America. Then cultivares have already been introduced and multiplied on a large scale. Clone performance trials have also been set up. Distribution of these hybrids to the countries participating in the project began in 1997, and it is to be stepped up in 1998. Around 40 cultivares will be chosen, multiplied and tested in clone trials under different soil and climatic conditions in the six project member countries. This research could lead to commercial production of the best hybrids by 2003.

4.3.3. Pilot Project In Tanzania

Coffee research in Tanzania has achieved the creation of thousands of hybrids plants established in Lyamungu

Reasearch Station . Their average level of yield, without any fungicide spraying, in Lyamungu, ismore than double

the commercial varietiesA rapid multiplication of the best individual trees is urgently to make these hybrids available to the coffee growers.It cannot be done through normal cuttins as the te of multiplication is too low.

The pilot propagation project that CIRAD is developing in Tanzania is:

* to start multiplying some promissing trees (10) to establish real clones in a wide multisite comparison trial
* to train scientist technicians in tissue culture in coffee propagation
* to star a small research laboratory inLyamungu to multiply in the future other selected trees
* to the prepare the future for commercial mass propagation: contacts have to be take with private sector

5. FIELD PERFORMANCE AND CONFORMITY

5.1. Definition of variation

We have known since the work by Larkin and Scowcroft in 1981 that tissue culture can cause modifications of the genome known as somaclonal variations. This notion covers three types of variation: (1) Heritable, stable, irreversible changes, (2) Unstable, reversible changes and (3) non-heritable, temporary changes known as epigenetic variations, which affect genome expression (Karp, 1991). Most of this variability is either due to chromosomal alterations, i.e. cuts, translocations, deletions, aneuploidy, polyploidy, gene amplification, transpositions, somatic cross-overs and one-off mutations (Evans and Sharp 1986), or, in the case of epigenetic mechanisms, to under-or overmethylation of the DNA. In the latter case, the variant phenotype is unstable. For instance, in oil palm, 50% of sterile palms revert to normality after seven years' flowering (Duval *et al.* 1997).

Somaclonal variations are put down to excessive use of phytohormones in the culture medium, particularly auxin, and to over-rapid cell proliferation. In general, somaclonal variations involve a disorganized cell growth phase such as callus or adventive meristem multiplication (Karp 1991). They affect most plant species, in addition to algae and fungi. Lastly, they are cultivar-dependent (Mohmed and Nabors 1990; Freytag *et al.* 1989). This has also been demonstrated in coffee (Söndhal and Lauritis 1992).

5.2. The case of coffee

In coffee, little data is available on the field performance and conformity of plants produced by somatic embryogenesis. The only known work was by Söndhal in Brazil (Söndhal and Bragin 1991; Söndhal and Lauritis 1992), but Nestlé is also known to have set up large-scale trials in Ecuador. Söndhal recorded variability of 10% in 12, 176 *C. arabica* plants evaluated. Among the variants, he observed modifications affecting leaf and branch morphology, plant size, fruit colour and shape, increased yields, variable ripening precocity and susceptibility to/tolerance of certain diseases.

Nestlé, on the other hand, has not attempted true-to-type reproduction, but uses somaclonal variation as a source of genetic variability. It is widely accepted that in species for which breeding systems are a limiting factor and in "primitive" species that have not undergone intensive selection - for instance coffee - somaclonal variation can release a new source of variability (Karp 1991). The percentage of variant plants remains very low - around 1% (personal communication) - and suggests relatively substantial genetic variability in coffee. For instance, the Arabusta, an interspecific hybrid with an unstable genome, apparently has more somaclonal variations. These results contradict those of Söndhal, since they suggest much lower rates of variants.

5.3. Work under way

To remedy this lack of information, PROMECAFE(Programa regional para la proteccion y modernizacion de la cafeicultura en America Centrale) decided to set up an extensive multi-site network with at least 20 sites in four Central American countries and a structure covering 50 000 plants. Moreover, specific studies are being carried out on the effect of certain culture conditions, such as suspension age (from 0 to 2 years) or genotype on the conformity of the plants regenerated.

t present, 1,100 in vitro plantlets including 650 somaplants from embryogenic calli of four hybrids are being evaluated in field trials, with 450 microcuttings of the same hybrids as controls, as microcuttings are known not to affect conformity. No difference in plant morphology has yet been observed, and most are about to flower.

One thousand two hundred other somaplants from high frequency embryogenic calli of five other hybrids are currently in the nursery, and no variations in morphology have yet been observed either. By the end of 1998, 3,200 somaplants obtained from calli or embryogenic suspensions of various ages will have been planted in Costa Rica. By the end of 1999, 60,000 *C. arabica* plants obtained from somatic embryos will have been planted in Central America. These plants were all produced by temporary immersion and under clearly defined culture conditions wholly compatible with commercial production.

These trials should provide definitive information about the conformity of the material produced by somatic embryogenesis under our culture conditions. It is important to bear in mind that 5% non-true-to-type plants is a commercially accepted figure. However, if serious fruiting problems were to arise, it would not be disastrous, as various strategies can be adopted to bring the figure below 5%, or even to eliminate all somaclonal variations. For instance, this was done with banana micropropagation (Côte *et al.* 1993).

6. CONCLUSION AND PROSPECTS

The results presented here show that somatic embryogenesis procedures are applicable to coffee on a large scale, irrespective of the species and genotype (Fig. 21).

In particular, the technique can be used to modify the conventional Arabica breeding strategy. Until recent years, development of new varieties of this species was geared towards pedigree breeding to produce a homozygous variety that could be distributed as seed. The process is relatively long and takes as long as 30-35 years.

The development of a vegetative propagation technique such as somatic embryogenesis should allow:

1. Orientation of genetic improvement programs towards a new strategy: the creation and use of F1 hybrids that can be obtained after a 10 to 15-year selection cycle ; this will enable breeders to shorten the selection cycle and also to make optimum use of genetic variability, above all by favouring heterosis. Such a program was launched seven years ago in Central America, involving CIRAD and ORSTOM;
2. Consideration of mass production, including use of the temporary immersion technique developed by CIRAD. Using such a technique to regenerate plants removes the need for isolation and manual transfer of somatic embryos required by the conventional *in vitro* procedure on a gel medium.
3. Consideration of new strategies such as genetic transformation. In effect, it is essential the rehability of plant regeneration from "cells" if such a strategy is to be implemented. This is now possible as the technique has been fully developed.

It is clear that on the brink of the third millennium, thought can now be given to new coffee growing strategies based on more rational use of existing biodiversity and on providing a more rapid response to the various constraints inherent to the crop.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

On special thanks go to Mrs N. Michaux-Ferrière (CIRAD) for her help, not only in histological studies of the somatic embryogenesis procedure, but also in writing up this section. We could also like to thank Daniel Alvard and Marc Lartaud (CIRAD) for their help and collaboration on this work.

8. REFERENCES

Alvard, D., Côte, F. and Teisson, C. (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana propagation. Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell Tissu Org. Cult. 32: 55-60.

Ameha, M. (1983) Heterosis in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease. I. First bearing stage. Acta Horticulture, 140: 155-161.

Ammirato, P.V. (1977) Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway: Interactions of abscisic acid, zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 59: 579-586.

Anzueto F. (1989) Recherche de la résistance aux nématodes dans une collection de Coffea spp.D.E.A,Univ. de Rennes-ENSAR, 29p.

Berthouly, M., Guzman, N. and Chatelet, P. (1987) Micropropagation *in vitro* de différentes lignées de *Coffea arabica* v. Catimor. In *12ème Colloque Scientifique International sur le Café* (Montreux, 29 juin - 3 juillet), ASIC, Paris, p. 462-467.

Berthouly, M. and Michaux-Ferrière, N. (1996) High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*: induction conditions and histological evolution. *Plant Cell and Organ Culture*, 44: 169-176.

Berthouly, M., Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C., Alemanno, L. and Teisson, C. (1995) Coffee micropropagation in liquid medium using temporary immersion technique. ASIC, 16ème Colloque, Kyoto 9-14 avril, Vol. II: 514-519.

Bertrand, B., Anzueto, F., Pena, M.X., Anthony, F., Eskes, AB.(1995) Genetic imrpovment of coffe for resistance te root-knot nematodes (Meloidogyne sp.) in Central America.IN XI Colloque Scientifique International sur le café,ASIC, Kyoto, Japon, p:630-636

Bertrand, B., Santacréo, R., Anthony, F., Etienne H., Charrier A. and Eskes, A.B. (1997) Behaviour of *Coffea arabica* F1 hybrids for resistance, production and technological qualities in Central America. ASIC, Nairobi 20-25 july.

Bettencourt, A.J. and Rodrigues, C.J.J.R. (1988) Principes and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. Chapter 6 in *Coffee: Agronomy*, R.J. Clarke, R. Macrae, eds., Elsevier Applied Science Publishers LTD, England, 4: 199-234.

Bouharmont, P. and Awemo, J. (1979) La sélection végétative du caféier robusta au Cameroun, *Café Cacao Thé*, 23: 227-237.

Capot, J (1977) L'amélioration du caféier robusta en Côte d'Ivoire. *Café Cacao Thé*, 21: 233-244.

Charrier, A. (1985) Progrès et perspectives de l'amélioration génétique des caféiers. In: *11ème Colloque Scientifique International sur le café*, (Lomé, 11-15 février), ASIC, Paris: 403-425.

De Garcia, E. and Menendez, A (1987) Embriogénesis somatica a partir de explantes foliares del cafeto "catimor". *Café Cacao Thé*, 31 (**1**): 15-22.

Deus, J. and Descroix, F. (1984) Le bouturage du caféier robusta dans le programme de replantation de la caféière au Togo. *Café Cacao Thé*, 28 (**3**): 165-178.

Dublin, P. (1980) Multiplication végétative *in vitro* de l'arabusta. *Café Cacao Thé*, 24 (**4**): 281-289.

Dublin, P. (1982) Culture de tissus et amélioration génétique des caféiers cultivés. In: *10ème Colloque Scientifique sur le café* (Salvador-Bahia, 11-14 octobre), ASIC, Paris, 433-459.

Dublin, P. (1984) Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*, 28 (**4**): 231-244.

Duval, Y., Amblard, P., Rival, A., Konan, E., Gogor, S. and Durand-Gasselin, T. (1997). Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Côte d'Ivoire. International Planters Conference, Kuala Lumpur, 21-22 May 1997 : 291-307.

Etienne, H., Bertrand, B., Anthony, F., Côte, F. and Berthouly, M. (1997 a) L'embryogenèse somatique, un outil pour l'amélioration génétique du caféier. ASIC, 17ème Colloque, Nairobi 21-25 juillet (sous presse).

Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, M.P., Berthouly, M. and Teisson, C. (1997 b) Improvement of somatic embryogenesis in Hevea brasilensis (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro* cellular and Development Biology.

Evans, D.A. and Sharp, W.R. (1986) Somaclonal and gametoclonal variation . Chapter 4. In Handbook of Plant Cell Culture;Tehniques and Applications. , D.A. Evans, W.R. Sharp and P.V. Ammirato, eds, Macmillan Publishing Company, New York, 4: 97-132

Freytag, A.H., Rao-Arelli, A.H., Anand, S.C., Wrather, J.A. and Owens, L.D. (1989) Somaclonal variation in soybean plants regenerated from tissue culture. Plant Cell Rep. 8: 199-202.

Haarer, A.E. (1969) Produccion moderna de cafe . Instituto del libro .Edicio revolucionaria R,La Habana .

Karp, A. (1991) On the current understanding of somaclonal variation. Oxford surveys of Plant Molecular and Cell Biology. 7: 1-58.

Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981) Somaclonal variation-a source of variability from cell cultures improvment.Theo.Appl.Genet. 60:197-214

Mohamed, A.S. and Nabors, M W (1990) Somaclonal variant plants and wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. Plant Cell Rep. 8: 558-560.

Monaco, L., Söndah,l M., Carvalho, A., Crocomo, O. and Sharp, W. (1977) Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: Reinert J. and Bajaj Y. (eds.) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture (pp 109-129). Springer-Verlag, Berlin.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapif growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Neuenschwander, B. and Baumann, T. (1992) A novel type of somatic embryognesis in *Coffea arabica*. Plant Cell Rep. 10: 608-612.

Pétiard, V., Courtois, D., Masseret, B., Delaunay, P. and Florin, B. (1987) Existing limitations and potential applications of plant cell cultures. In: *Proceedings 4th European Congress on Biotechnology* (Amsterdam), O.M. Neylssl, R.R. Van der Meer, K.C.A.M. Lyuben, eds. Elsevier Science Publisher B.V., 157-169.

Pierson, E.S., Van Lammeren, A.A.M., Schel, J.H.N. and Staritsky, G. (1983) *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 115: 208-216.

Söndhal, M.R. and Sharp,Wr. (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysio. Bd. S. 81: 395-408.

Söndhal, M.R. and Lauritis J.A. (1992) Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops. Biotechnology in agriculture 8: 401-420.

Söndhal, M.R. and Bragin, A. (1991) Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. In: ASIC, 14ème Colloque Scientifique International sur le Café, San Francisco 14-19 juillet, p 701-710.

Srinivasan, C.S. and Vishveshwara, S. (1978) Heterosis and stability for yield in arabica coffee. *Indian Genet. and Plant Breed.*, 38: 416-420.

Staritsky, G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta. Bot. Neerl.*, 19 (**4**): 509-514.

Teisson, C. and Alvard, D. (1994) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium : temporary immersion proceedings of the VIII. I. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Florence, Italy 12-17 June: 105-109Vasil, V. and Vasil K. (1986) Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension

cultures of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 124: 399-408.

Van der Vossen, H.A.M. and D.J. Walyaro, D.J. (1981) The coffee breeding programme in Kenya: a review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. *Kenya Coffee*, 46 (**541**): 113-130.

Van der Vossen, H.A.M. (1985) Coffee selection and breeding. Chapter 3 in Coffee, botany, biochemistry and production of beans and beverage,M.N.Clifford, K.C. Willsons,eds.,Crom Helm Ltd, Provident House, Burrel Road, p. 48-96.

Yasuda, T., Fujii, Y. and Yamaguchi, T. (1985) Embryogenic callus induction from *Coffe arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell. Physiol.*, 26 (**3**): 595-597.

Zamarripa, A., Ducos, J.P., Tessereau, H., Bollon, H., Eskes, A.B and Petiard, V. (1991) Developpement d'un procédé de multiplication de masse du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide.In 14ème Colloque Scientifique In ternational sur le café,ASIC, San Francisco, p: 392-402.

Zamarripa ,A. (1993) Etude et développement de l'embryogenèse somatique en milieu liquide du caféier (*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et hybride Arabusta). Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, France, 191 p.

DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS COM VISTAS A UNIFORMIDADE DE MATURAÇÃO DOS FRUTOS DE CAFÉ

Luiz Filipe Pereira, Adilson K. Kobayashi e Luiz Gonzaga Esteves Vieira

IAPAR - Laboratório de Biotecnologia - Londrina - PR – Cx Postal 481 - CEP86000-970

RESUMO

A qualidade da bebida do café está diretamente relacionada com a maturação dos frutos. Em regiões com boa distribuição pluviométrica o aparecimento de diferentes floradas contribui para uma maturação desuniforme dos frutos, com efeito direto no preço do produto. As alternativas tradicionais para resolver estes problemas - o uso de reguladores de crescimento e o emprego de colheita seletiva - apresentam desvantagens de ordem agronômica (queda de folhas e frutos, diminuição da qualidade da bebida) e econômica (aumento do custo de produção). Em frutos climatéricos, um acúmulo do fitorregulador etileno é observado nas fases iniciais do processo de maturação. Uma das alternativas para obter uma maior uniformidade na colheita dos frutos de café seria a inibição da síntese de etileno durante os estágios inicias de maturação. Recentemente, com a clonagem dos genes envolvidos na síntese do etileno foi possível a manipulação da produção deste regulador de crescimento em frutos em processo de maturação. Através da inibição da expressão das enzimas ACC-sintase e ACC-oxidase pelo uso da tecnologia do RNA anti-senso, a produção de etileno tem sido bloqueada em frutos de várias espécies, como o tomate e o melão. Este trabalho propõe a transformação de plantas de café com gene anti-senso da enzima ACC-oxidase e seleção de variedades transgênicas apresentando reduzida produção de etileno e inibição da maturação de frutos ainda na planta. Isto viria a diminuir a desuniformidade de maturação dos frutos, facilitando as operações de colheita e aumentando a qualidade da bebida.

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético convencional do cafeeiro tem obtido sucesso no atendimento das demandas do setor produtivo, usando diferentes métodos como seleção de populações naturais, seguida de cruzamentos e avaliação da progênie, retrocruzamentos e cruzamentos interespecíficos (Söndahl et al., 1984; Söndahl e Loh, 1988). Esses esforços levaram a aumentos significativos de produção através do lançamento de novas cultivares de cafeeiro, com características genéticas superiores, que estão sendo introduzidas nas lavouras brasileiras. Entretanto, o melhoramento genético do cafeeiro é limitado por algumas características intrínsecas à esta cultura. O longo ciclo reprodutivo gera uma exposição prolongada a diversos estresses abióticos e bióticos, facilitando o aparecimento de novas doenças e pragas. Também, o longo período juvenil impede que um ciclo de seleção seja completado em menos de 25 anos, dependendo da estratégia de recombinação utilizada.

Dessa maneira, a incorporação de técnicas biotecnológicas poderão reduzir o tempo necessário para o desenvolvimento de novos genótipos, com maior produtividade e qualidade. Entre essas técnicas, a transformação genética abre novas perspectivas, permitindo a incorporação, de uma maneira muito mais rápida, de características desejáveis às espécies perenes, sem alterar sua organização genética global (Manders et al., 1992; Jouanin et al., 1993; Haines, 1994).

Através do uso de técnicas de transformação genética, notoriamente a transformação via *Agrobacterium* ou biobalística, a introdução de novos genes em plantas aparece como uma importante ferramenta que pode ser aplicada em áreas que vão desde os programas de melhoramento até estudos básicos de genética, fisiologia e biologia molecular de plantas. A produção de plantas geneticamente modificadas (PGMs) tem também uma grande importância econômica pela possibilidade de incorporar novas caracterísiticas agronômicas às plantas cultivadas como resistência a herbicidas, insetos ou patógenos e melhora na qualidade dos produtos. No ano de 1998 a área global cultivada com PGMs foi de cerca de 28 milhões de hectares sendo que a previsão do plantio 1999 é de cerca de 45 milhões de hectares (James, 1998). Atualmente, a soja, o milho, a canola e o algodão representam 98% deste mercado. Nos próximos anos PGMs de batata, tomate, melão, mamão, alfafa, arroz e tabaco, entre outras, devem começar a ser cultivadas em larga escala. Em café (*Coffea spp.*) PGMs com genes de *Bacillus thuringiensis* com resistência a insetos estão em fase de testes de campo (Leroy, *comunicação pessoal*). A transformação de café no entanto está longe de ser um trabalho de rotina, sendo que estudos básicos em cultura de tecidos e, principalmente, em transformação via

Agrobacterium ou biobalística são necessários. A seguir discutiremos os requisitos básicos para a transformação de plantas de café, assim como a aplicação desta tecnologia na produção de PGMs com maior uniformidade de maturação dos frutos.

CULTURA DE TECIDOS E SELEÇÃO *IN VITRO*

Cultura de tecidos de café. A chave para o sucesso de qualquer trabalho de transformação de plantas é ter um sistema de regeneração de plantas *in vitro* eficiente. Os requisitos ideais para tanto são: 1) alta capacidade de regeneração no menor tempo possível; 2) compatibilidade com sistemas de transformação e seleção *in vitro*; e 3) independência de resposta entre genótipos. Poucas espécies preenchem esses requisitos e infelizmente o café não é uma delas. A cultura de tecidos de café, após os estudos iniciais de Staritsky (1970), teve um grande avanço com os trabalhos de regeneração de embriões somáticos no começo da década de 80 (ver Sondahl et al. 1984, para revisão). A produção de embriões somáticos a partir de calos provenientes de explante foliares foi a base para o desenvolvimento de trabalhos de propagação *in vitro* em larga escala em meio líquido (Zamarripa et al., 1991; Noriega e Sondahl, 1993). A formação de calos, se dá em meio de cultura suplementado com os fitorreguladores ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) em conjunto com cinetina (KIN), em concentrações que variam entre diferentes espécies e cultivares. Após a formação de calos o tecido é transferido para meio de indução de embrióides com sais inorgânicos reduzidos pela metade. No meio de indução uma maior proporção de KIN em relação a ANA é utilizada. O tecido embriogênico formado pode ser multiplicado em meio líquido suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou transferido para meio de desenvolvimento dos embriões sem a presença de fitorreguladores. Alternativamente, a regeneração "direta" de embriões somáticos em meio com citoquininas (BAP ou 2-isopentenil-adenina), sem a passagem por uma fase de calos também foi demonstrada (Yasuda et al., 1985; Hatanaka et al., 1991).

Apesar dos vários estudos já realizados alguns problemas quanto a cultura de tecido ainda persistem. A regeneração ocorre mais facilmente em *C. canephora*, encontrando-se uma dificuldade maior para regeneração embriogênica direta ou indireta de *C. arabica*. O tempo para obtenção de embriões é tambem mais demorado para *C. arabica* (5-8 meses) do que para *C. canephora* (5-8 semanas no caso de embriogênese direta) dificultando o trabalho de transformação e seleção. Além disso, a produção de embriões secundários até hoje foi pouco estudada, mas é uma alternativa para se facilitar o processo de transformação.

Identificação e seleção dos explantes in vitro. Nos trabalhos de transformação genética de plantas é necessário o uso de genes marcadores e de seleção além dos genes de interesse agronômico ou científico. Os genes marcadores servem para verificar se o processo de transformação está sendo feito corretamente, identificando células ou tecidos transformados. Um dos genes mais usados como marcador é o *gusA* que codifica a enzima -glucuronidase (GUS) e proporciona uma análise histoquímica ou fluorescente do material transformado (Jefferson et al., 1987). Na análise histoquímica o tecido transformado em contato com o substrato para a enzima GUS torna-se azul indigo e é facilmente identificado. Outros marcadores muito utilizados são os de genes de fluorescência verde (GFP), que podem ser detectados *in vivo* ao contrário das análises com GUS.

Dentro de um protocolo de transformação é muito importante que o sistema de seleção *in vitro* seja eficiente, permitindo que o tecido transformado se prolifere com um mínimo de formação de tecido ou embriões não transgênicos. A seleção é feita geralmente com a introdução de genes de seleção para resistência a herbicidas ou antibióticos, juntamente com outros genes de interesse. Para tanto, é necessário que se estabeleçam doses do agente seletivo que inibam aproximadamente 95 % da formação de calos ou embriões em tecido não transformado. O gene de neomicina fosfotransferase (*npt* II) que fornece resistência ao antibiótico canamicina, foi um dos agentes seletivos mais usados nos primeiros trabalhos de transformação. Hoje em dia, os agentes seletivos mais utilizados conferem resistência a herbicidas, a maioria com atividade residual baixa, como o glufosinato, o glifosato e o imazapyr que, respectivamente, conferem resistência aos herbicidas Finale®, Round-UP® e Arsenal®. A dose de resposta pode variar de acordo com a espécie e tipo de explante utilizado. Em nosso laboratório foi verificado que em explantes foliares as doses do agente seletivo podem variar entre *C. arabica* e *C. canephora* (Kobayashi et al., 1998). Ambas espécies apresentaram uma boa inibição na formação calos ou embriões com 0,5 nM de imazapyr. No entanto, quando a seleção foi feita com glufosinato, a concentração necessária para

inibir a formação de calos em *C. arabica* foi dez vezes maior do que para *C. canephora* (TAB. 1).

TÉCNICAS DE TRANSFORMAÇÃO

Transformação via agrobacterium. Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria gram-negativa que naturalmente tem a capacidade de transferir fragmentos de DNA (T-DNA) para as plantas. Normalmente, a bactéria transfere genes que desregulam o crescimento celular (chamados oncogenes), ocasionando o aparecimento de galhas, em conjunto com genes de opinas que produzem carbohidratos e aminoácidos usados pela bactéria para alimentação. Através das técnicas de engenharia genética, é possível substituir os genes da bactéria no T-DNA por genes com características desejáveis. A bactéria serve portanto como um vetor biológico para transformação. A eficiência deste processo de transformação depende de vários fatores. O principal é a capacidade da bactéria de infectar a planta, ou seja sua especificidade, que depende do reconhecimento de sinais bioquímicos específicos entre a planta e o *Agrobacterium.* Essa interação entre a bactéria e hospedeiro é possível na maioria das dicotiledôneas, mas é limitada entre as monocotiledôneas. Outros fatores que afetam a transformação são a densidade de Agrobacterium usada, o tempo de incubação e co-cultivo dos explantes com a bactéria, pré-tratamento dos explantes e o uso de culturas auxiliares para transformação ("feed layers").
PGMs de café visando resistência a insetos foram obtidas, tanto para *C. canephora* como para *C. arabica* usando *Agrobacterium* (Berthouly, 1997). A transformação foi muito mais eficiente em *C. canephora* onde cerca de 100 eventos de transformação independentes foram obtidos, enquanto que em *C. arabica* houve somente 10 eventos de transformação (Leroy, comunicação pessoal).

Transformação via biobalística. O uso da biobalística para transformação vegetal foi criado por Sanford (1987) e consiste da aceleração de partículas de metal conjugadas com o DNA contra o tecido vegetal. Neste processo, o DNA é precipitado em partículas de metal, que são impulsionadas em alta velocidade, através de uma pressão de gás ou descarga elétrica, para penetrarem no tecido. Vários fatores afetam a eficiência da transformação via biobalística, como por exemplo a velocidade utilizada para penetração das partículas, o tamanho das partículas, o pré-cultivo dos explantes e o tipo de seleção empregado. O processo de biobalística é também uma ferramenta importante para a avaliação de construções de genes que podem ser analisados transientemente, ou seja, para verificar a expressão dos genes introduzidos sem que haja necessariamente uma integração estável destes no genoma. A introdução de genes via biobalística em café foi demonstrada por Boxtel et al., (1995), onde foi observada a expressão transiente de GUS em calos embriogênicos, embriões maduros e folhas.
A transformação via biobalística apresenta vantagens e desvantagens em relação a transformação por *Agrobacterium*. Ela independe da compatibilidade entre a planta e a bactéria e qualquer tipo de tecido pode ser usado para a transformação. É uma técnica que vem sendo utilizada não somente em transformação de plantas, mas em fungos, protozoários, insetos e até animais. Entretanto, ela apresenta uma eficiência menor do que a transformação via *Agrobacterium* e necessita de um eficiente processo de regeneração *in vitro* (Pereira e Erickson, 1995).

eletroporação de protoplastos. A utilização de protoplastos (célula vegetal sem a parede celular) foi muito usada em experimentos de transformação na década de 70 e começo da de 80. Ela permite um alto grau de transformação, mas apresenta grandes dificuldades na regeneração de plantas. Após a obtenção dos protoplastos, através do emprego de enzimas para digestão da parede celular, os protoplastos mais o DNA exógeno são submetidos a descargas elétricas que ao abrir poros na membrana celular permite a passagem do DNA para o interior das células. Apesar de ser um método atualmente pouco utilizado para transformação, ele tem sua validade principalmente para estudo de construções de genes e de expressão transiente. Em café, o cultivo de protoplastos e os primeiros resultados em manipulação genética destes através de eletroporação foram relatados (Barton et al., 1991). Entretanto, as plantas transformadas não foram capazes de florescer, demonstrando que o uso rotineiro deste protocolos é ainda limitado devido as dificuldades associadas a de regeneração de plantas a partir da cultura de protoplastos.

CONTROLE DA MATURAÇÃO DOS FRUTOS

A qualidade da bebida do café está diretamente relacionada com a maturação dos frutos. Regiões cafeicultoras onde há uma boa distribuição pluviométrica no final do inverno e começo da

primavera apresentam floradas sucessivas que produzem frutos em diferentes estágios de amadurecimento. A maturação desuniforme dos frutos associada com a colheita de derriça fazem com que haja uma queda na qualidade do café produzido, devido principalmente a presença de frutos verdes ou secos.

Atualmente, para evitar que a baixa uniformidade na maturação dos frutos prejudique a qualidade do produto é necessário utilizar a colheita parcelada e seletiva dos frutos maduros.

Neste sistema, o número de colheitas em uma mesma árvore pode variar de 3-5, dependendo do número de floradas. Apesar da colheita seletiva ser adotada em vários países produtores de café, é improvável que venha a ser empregada em larga escala no Brasil devido ao seu alto custo.

Uma das alternativas para uma maturação uniforme dos frutos é o controle da síntese do fitorregulador etileno. No café, assim com nos demais frutos climatéricos, ocorre um grande aumento da síntese de etileno durante os estágios iniciais da maturação (FIG.1).

Hoje, já se tem um bom entendimento da síntese de etileno nas plantas, sendo que os principais genes envolvidos na sua síntese, a 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-sintase e a ACC-oxidase já foram isolados em várias espécies, possibilitando a manipulação da produção de etileno em frutos em processo de maturação. Através da inibição da expressão das enzimas ACC-sintase e ACC-oxidase pelo uso da tecnologia do RNA anti-senso, a produção de etileno tem sido bloqueada em frutos de várias espécies (Oeller et al., 1991; Ayub et al., 1996). As implicações comerciais derivadas destes trabalhos motivaram grandes investimentos em pesquisa para a obtenção de plantas transgênicas com modificações em características agronômicas desejáveis, tais como alterações em sabor, aroma e textura dos frutos. A tecnologia de RNA anti-senso consiste na transformação genética do mesmo gene da planta no sentido inverso, produzindo um RNA-mensageiro inverso do RNA-mensageiro original ocasionando a formação e duplexes de RNAs que inibem a tradução.

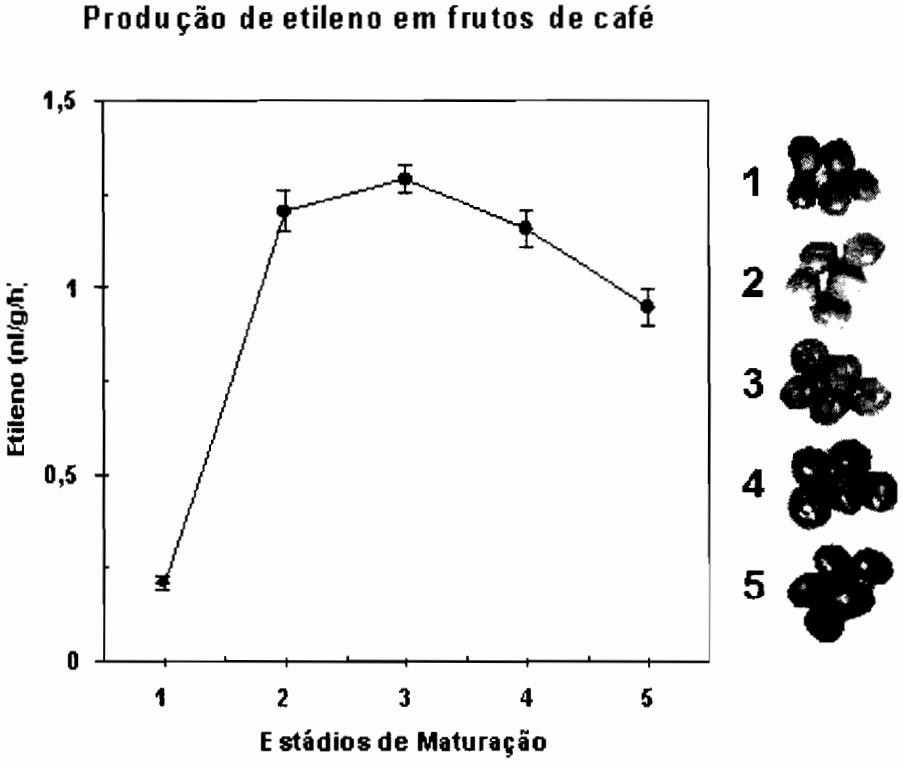


Fig. 1. Frutos de *Coffea arabica* cultivar Iapar 59 foram coletados de plantas da estação experimental do IAPAR, Londrina, separados quanto a sua coloração e inoculados em frascos vedados com 10 frutos cada e três repetições. Os estádios de maturação de acordo com a ilustração foram:1-verde; 2-avermelhado; 3-vermelho; 4-cereja; 5-cereja-passa.

Em nosso laboratório recentemente foi iniciado um projeto que propõe a transformação de plantas de café com gene anti-senso da enzima ACC-oxidase e seleção de variedades transgênicas apresentando reduzida produção de etileno e inibição da maturação de frutos ainda na planta. Isto viria a diminuir a desuniformidade de maturação dos frutos, facilitando as operações de colheita e aumentando a qualidade da bebida.

REFERÊNCIAS

Ayub, R., M. Guis, M.B. Amor, L. Gillot, J.P. Roustan, A. Latche, M. Bouzayen, and J.C. Pech. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nature Biotechnology 14:862-866.

Barton, C., T. Adams, and M. Zarowitz. 1991. Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plantlets. ASIC, 141 Coll., San Francisco, USA.

Berthouly, M. 1997. Biotecnologias y tecnicas de reproduccion de materiales promisorios em *Coffea arabica*. Simpósio Latinoamericano de caficultura XVIII:25-50.

Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida, and T. Yamaguchi. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. Plant Cell Reports 10:179-182.

Haines, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement. FAO, Rome. 230 p.

James, C. 1998. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 1998. ISAAA Briefs No.8. ISAAA: Ithaca, NY.

Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan . 1987. GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive marker in higher plants. EMBO Journal 6:3901-3907.

Jouanin, L, A.C.M. Brasileiro, J.C. Leplé, G. Pilate, and D. Corn. 1993. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. Ann. Sci.For. 50: 325-336.

Kobayashi, A.K., J.C. Bespalhok, L.F. Pereira, and L.G. Vieira. 1998. Effects of imazapyr and glyphosate on callus proliferation and somatic embryogenesis in coffee. Genetics and Molecular Biology Supl. 21:387.

Manders, G., M.R. Davey, and J.B. Power. 1992. New genes for old trees. J. Exp. Botany 43: 1181-1190.

Noriega, C. and Sondahl, M. 1993. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. ASIC, 15:73-81.

Oeller, P.W., L. Min-Wong, L.P. Taylor, D.A. Pike, and A. Theologis. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science 254:437-439.

Pereira, L.F. and L. Erickson, 1995. Stable transformation of alfalfa (Medicago sativa L.) by particle bombardment. Plant cell rep.14:290-293.

Söndahl, M.R.; Nakamura, T.; Medina-Filho, H.P.; Carvalho, A.; Fazuoli, L.C. & Costa, W.M. 1984. In: Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. & Yamada, Y. (eds) Handbook of Plant Cell Culture, vol 3. Macmillan Pub. Co., New York, pp 564-590.

Söndahl, M.R. and W.H.T. Loh, 1988. In: Clarke, R.J. & Macrae, R. (eds) Coffee, vol 4. Elsevier, London, pp 235-261.

Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus cultures of coffee. Acta. Bot. Neerdl. 19:509-514.

Yasuda, T., Y. Fujii, and T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol. 26:595-597.

Zamarripa, A., J.P. Ducos, H. Bollon , M. Dufour, and V. Petiard. 1991. Production d'embryons somatiques de cafeier em milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. Café Cacao Thé 35:233-244.

PROGRAMA BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA AO CAFEEIRO

Alemar B. Rena e Antônio de Pádua Nacif [1]

[1] Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, Brasil.

BREVE HISTÓRIA DA BIOTECNOLOGIA DO CAFEEIRO NO BRASIL

Provavelmente, o primeiro trabalho de biotecnologia do cafeeiro foi publicado por Staritsky, em 1970. No Brasil, a primeira referência é a de Sharp *et alii*, em 1973, mas desde 1970, Sondhal e colaboradores, no IAC, já estavam pesquisando na área. Os primeiros trabalhos que trouxeram uma contribuição concreta para a biotecnologia do cafeeiro foram os de Sondhal e Sharp (1977) e Sondhal *et alii* (1979a, 1979b), quando se demonstrou a embriogênese somática de alta e baixa freqüência. Este início foi, de certa forma, bem revisto por Sondhal e Sharp (1979). Infelizmente, em 1984, o Dr. Maro Sondhal deixou o Brasil e a biotecnologia do cafeeiro ficou órfã até meados da década de noventa, salvo alguns esforços solitários realizados principalmente por Luiz Carlos S. Ramos, no IAC, João Manetti Filho, no IAPAR, Moacir Pasqual, na UFLA e Laércio Zambolim, na UFV. Mas, na verdade, muito pouco se acrescentou ao que já se sabia internacionalmente, em primeiro lugar, pela natureza lenta intrínseca da própria pesquisa e, em segundo, pelos recursos financeiros escassos. O que se fez, basicamente, nesse período, foi adaptar metodologias às variedades comerciais brasileiras. Assim, por exemplo, pequeno progresso foi feito com respeito à micropropagação em escala comercial de germoplasmas de café, conquista altamente desejável à cafeicultura.

Em 1977, com a constituição do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D/Café), novas perspectivas foram abertas à biotecnologia do cafeeiro. Já sob a influência do Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (PNP&D/Café), os primeiros trabalhos brasileiros em biologia molecular foram publicados recentemente pelo grupo do BIOAGRO, na UFV.

OBJETIVOS GERAIS DO PROGRAMA DE BIOTECNOLOGIA DO CAFEEIRO NO BRASIL

Ainda que se considere a biotecnologia uma área muito jovem da ciência, o Brasil tem se descuidado da sua aplicação ao cafeeiro. São poucos os grupos brasileiros que a ela se dedicam e a pesquisa que eles desenvolveram até 1998 foi isolada, bastante incipiente e sem uma política de coordenação nacional e de ajuda financeira adequada. Os grupos trabalharam quase sempre em laboratórios mal montados e com mão-de-obra especializada deficiente, além de não estarem perseguindo um objetivo claro e comum. A pesquisa que eles realizaram buscou sempre obter informações priorizadas pelo grupo, sem integração com outros grupos, o que teria permitido a concretização de objetivos mais amplos, em menor tempo, a menor custo e que atendessem aos anseios da cafeicultura brasileira.

O mérito maior deste programa, que agora se implanta, é a promoção da integração da pesquisa biotecnológica cafeeira no Brasil e a definição de prioridades, sem perder de vista a cafeicultura como um todo. Ainda mais, acena-se ao pesquisador com a possibilidade de financiamento da pesquisa, em geral o seu maior e às vezes único problema.

Há grandes diferenças laboratoriais e humanas entre as instituições brasileiras que se propõem a realizar pesquisa de biotecnologia cafeeira. Algumas são mais completas e outras muito deficientes. Conclui-se que todas necessitam de mão-de-obra técnica especializada, principalmente de indivíduos de nível médio, além de recursos financeiros específicos para a capacitação laboratorial e de manutenção da capacidade física instalada.

As ações do PNP&D/CAFÉ buscam estabelecer metas, de acordo com a demanda da cafeicultura brasileira. A biotecnologia é uma ferramenta fundamental, junto ao melhoramento clássico, na obtenção de híbridos de café portadores de características agronômicas e industriais de processamento desejáveis. Há cada vez mais a necessidade de se ter cafeeiros que melhor aproveitem os fatores de produção como a luz, a água e os minerais, que sejam resistentes a pragas, doenças e nematóides, o que apresenta um forte apelo ecológico, e com características de qualidade de grão desejável à indústria. Mediante o melhoramento clássico, já foram sintetizados muito híbridos que apresentam várias destas características, mas que, pela sua natureza genética, não podem ser propagados via sementes. Daí a imperiosa necessidade de se desenvolver técnicas de micropropagação vegetativas que permitam a exploração desses híbridos em escala

comercial. Esta é a prioridade número um deste programa.
O processo de obtenção de novos híbridos e variedades deve ser contínuo, mas, como o cafeeiro é um planta perene, pode demandar décadas mediante o melhoramento clássico. Daí a necessidade urgente de se desenvolver técnicas de biologia celular e molecular que permitam acelerar o melhoramento do cafeeiro. Hoje, há grande interesse no reconhecimento e na caracterização ao nível de DNA dos grandes germoplasmas, com fins de melhor orientar a manipulação genética no melhoramento via a biotecnologia e de melhor descrever as plantas melhoradas com vistas a obtenção de patentes e outras apropriações legais.
Também, cada vez mais está-se usando no Brasil o processo de preparo do café por via úmida. Esse procedimento gera um problema ambiental, que é o grande volume de resíduos do processamento do café na propriedade agrícola, que deve ser adequadamente eliminado, sem a contaminação do solo e dos cursos de água. Problemas semelhantes surgem com os restos da indústria do café solúvel. A biotecnologia pode prover bioprocessos que permitam transformar esses resíduos em subprodutos inócuos, ou mesmo úteis, ao homem e ao meio ambiente.

PROJETOS E SUBPROJETOS DO PROGRAMA

Os projetos e subprojetos que constituem o programa de Biotecnologia Aplicada ao Cafeeiro são apresentados a seguir.

Projeto I: Micropropagação e preservação de propágulos.
Líder: Luis Carlos S. Ramos, IAC.
Objetivos:
Este projeto tem prioridade máxima e visa a multiplicação de gemas nodais ou axilares e a embriogênese somática, em biorreatores. Serão desenvolvidas técnicas de micropropagação em escala comercial de vários germoplasmas (cultivares e híbridos) do cafeeiro. Ao mesmo tempo, serão desenvolvidos protocolos para a preservação do material micropropagado, o que facilitará o seu transporte e comercialização.
Subprojetos:
Micropropagação do cafeeiro (*Coffea* sp) via embriogênese somática e biorreator do tipo imersão temporária e imersão permanente.
Responsável: João Batista Teixeira, CENARGEN.
Bases preliminares para a micropropagação do cafeeiro mediante o cultivo de gemas nodais via biorreatores.
Responsável: Luis Pedro Barrueto Cid, CENARGEN.
Embriogênese somática indireta via cultura líqüida em genótipos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.
Responsável: Antônio Teixeira Cordeiro, UFV.
Produção *in vitro* de café Conilon.
Responsável: Marcos Oliveira Athayde, EMCAPA.
Propagação de híbridos de cafeeiro usando técnicas de biotecnologia como suporte a programas de melhoramento genético.
Responsável:Moacir Pasqual, UFLA.
Clonagem de plantas especiais de cafeeiros para estudos agronômicos.
Responsável: Luis Carlos S. Ramos, IAC.

Projeto II: Genoma e citogenética do cafeeiro.
Líder: Ney Sussumu Sakiyama, UFV.
Objetivos:
Neste projeto serão estabelecidos a variabilidade, o mapeamento genético e, finalmente, o mapa genômico do cafeeiro. Primeiramente, este estudo fornecerá subsídios moleculares ao melhoramento genético clássico e ao biotecnológico, permitindo a manipulação mais consciente do germoplasma. Em segundo lugar, constituir-se-á numa ferramenta imprescindível na identificação, separação e classificação do germoplasma cafeeiro disponível no Brasil. E, em terceiro lugar, propiciará a oportunidade da legitimação da propriedade genética, incluindo a obtenção de patentes de plantas melhoradas.
Subprojetos:
Caracterização de genótipos de *Coffea canephora* pelo uso de marcadores moleculares RAPD.
Responsável: Maria Amélia Gava Ferrão, EMCAPA.
Mapeamento molecular e uso de seleção assistida por marcadores de DNA para ferrugem, nematóide e antracnose do cafeeiro.
Responsável: Carlos Roberto Riede, IAPAR.
Identificação de cultivares de cafeeiros (*Coffea arabica*) por marcadores moleculares.
Responsável: Maria Lucia Crochemore, IAPAR.
Marcadores moleculares para caracterização de espécies e variedades de *Coffea* e para genes de interesse agronômico.
Responsável: Paulo Maurício Ruas, UE Londrina.
Caracterização de cafeeiros utilizando marcadores moleculares: identificação de linhagens e variedades do Instituto Agronômico de Campinas.
Responsável: Carlos Augusto Colombo, IAC.
Desenvolvimento de marcadores AFLP para a análise genômica em cafeeiro.
Responsável: Messias Gonzaga Pereira, UENF.

Desenvolvimento de marcadores de DNA para o melhoramento genético do cafeeiro.
Responsável: Ney Sussumu Sakiyama, UFV.
Citogenética molecular de germoplasma de café.
Responsável: Carlos Roberto de Carvalho, UFV.
Caracterização citológica de espécies e de cultivares de *Coffea* spp.
Responsável: Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio, IAC.

Projeto III: Mutagênese, hibridação somática e produção de haplóides
Líder: João Batista Teixeira, CENARGEN.
Objetivos:
Neste projeto procura-se estimular a variabilidade genética no cafeeiro, a introgressão de genes de resistência a moléstias e pragas, tanto em cultivares Arábicos como em clones de Canéfora e a produção de plantas de café haplóides e cultivares em homozigose.
Subprojetos:
Cultura de tecidos em *Coffea* para a produção de variantes somaclonais.
Responsável: Antônio Teixeira Cordeiro, UFV.
Detecção de variação somaclonal em *Coffea canephora* através do uso de marcadores RAPD.
Responsável: Maria Amélia Gava Ferrão, EMCAPA.
Cultura de anteras de *Coffea arabica*.
Responsável: Moacir Pasqual, UFLA.

Projeto IV: Desenvolvimento de cafeeiros transgênicos.
Líder: Luiz Gonzaga E. Vieira, IAPAR.
Objetivos:
Desenvolver metodologia para obtenção de plantas transformadas de café. No presente projeto, serão pesquisadas tanto técnicas básicas de transformação como serão desenvolvidos subprojetos aplicáveis. É um projeto que apenas se inicia, que apresenta elevada complexidade e alto custo, ademais de ser demorado e não se espera obter qualquer planta transgênica em menos de 10 anos.
Subprojetos:Manipulação genética da síntese de etileno no café visando a uniformidade de maturação dos frutos.
Responsável: Luiz Gonzaga Esteves Vieira, IAPAR.Transformação de *Coffea* sp visando a obtenção de plantas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima sintase do ácido hidroxiacético (AHAS).
Responsável: Luiz Gonzaga Esteves Vieira, IAPAR.Introdução e expressão de genes transgenes em cafeeiro (*Coffea* sp) através do processo biobalístico e do sistema *Agrobacterium*.
Responsável: Ana Cristina Miranda Brasileiro, CENARGEN.

Projeto V: Fermentação e manejo de resíduos do café.
Líder: Carlos Ricardo Soccol, UFPR.
Objetivos:Desenvolver bioprocessos para a detoxificação e valorização de bioresíduos de café e a produção de esporos de fungos, bactérias e toxinas utilizadas no biocontrole de nematóides.
Subprojetos:
Desenvolvimento de bio-processos para detoxificação e valorização de bio-resíduos sólidos do café no Estado do Paraná.
Responsável: Carlos Ricardo Soccol, UFPR.
Desenvolvimento de bio-processos para produção de esporos de fungos, bactérias e toxinas utilizados no bio-controle de nematóides em café.
Responsável: Carlos Ricardo Soccol, UFPR.

POSSIBILIDADE DE COOPERAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL E INTERNACIONAL.

No Brasil, fora as instituições associadas ao CBP&D/ Café e as recém-associadas ao subprograma de biotecnologia, há pouca possibilidade de cooperação técnico-científica na área de biotecnologia aplicada ao cafeeiro. Há, no entanto, vários grupos de biotecnologia aplicada a outras culturas, especialmente na área molecular, e em menor escala na de micropropagação, que poderiam permitir algum intercâmbio, possibilitando o treinamento do pessoal do café. Mas a contribuição seria pequena. No setor privado nacional, há a empresa FITOLINK, de propriedade do Dr. Maro Sondhal, situada em Ribeirão Preto, São Paulo, que tem ampla experiência em micropropagação do cafeeiro. Esta talvez seja a única possibilidade concreta de parceria que poderia ser vantajosa para os pesquisadores do CBP&D/ Café, no Brasil.
No âmbito internacional, a possibilidade maior e profícua de convênios, com vistas aos estudos de biotecnologia do cafeeiro, seria com a França. Neste país, os grupos do CIRAD, em Montpellier, e da Nestlé, em Tours, poderiam contribuir tanto na área de micropropagação como na área molecular. Mas o forte deles é mesmo a micropropagação, tendo sido obtidos grandes avanços na embriogênese somática. Portanto, convênios como o CIRAD e a Nestlé são altamente desejáveis. Outras possibilidades de parcerias menores poderiam também ser buscadas em Cuba e na Costa Rica, onde há alguma experiência de micropropagação.

REFERÊNCIAS

Sharp, W.R., L.S. Caldas, O.J. Crócomo, L.C. Mônaco e A. Carvalho. 1973. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. Phyton 31: 67-74.

Sondhal, M.R. e W.R. Sharp. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 81: 395-408.

Sondhal, M.R. e W.R. Sharp. 1979. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. *In* W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddok e V. Raghavan (eds) Plant cell and tissue culture - Principles and applications. Ohio State University Press, Columbus, USA.

Sondhal, M.R., J.L. Salysbury e W.R. Sharp. 1979a. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. Z. Pflanzenphysiol. 94: 185-188.

Sondhal, M.R., D.A. Spahlinger e W.R. Sharp. 1979b. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 94: 101-108.

Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neerl. 19: 509-514.

APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFÉ, EN COLOMBIA.

Germán Moreno, Myriam de Peña, Ricardo Acuña, María Eugenia Aponte, Juan Carlos Herrera, Diana Molina, Alvaro Gaitán, Marco Cristancho, Pilar Moncada, Carmenza Góngora y Gabriel Cadena.

CENICAFE, Chinchiná, Colombia.E-mail: fcgmor@cafedecolombia.com

INTRODUCCION:

El mejoramiento genético del café en Colombia tiene una trayectoria cercana a los 60 años, durante los cuales se han conseguido resultados sobresalientes con los que se ha dado respuesta a los problemas mas apremiantes de la caficultura nacional (Moreno, 1994). En las ultimas décadas se han producido en el mundo avances muy importantes en el campo del cultivo in vitro de tejidos y de la biología molecular, los cuales han motivado a los investigadores en café a buscarles aplicaciones en los programas de mejoramiento genético, con el fin de hacerlos mas eficientes (Anthony et al, 1997; Petiard et al, 1993).

La finalidad de esta exposición es, de una parte, referir las experiencias de CENICAFE al poner en marcha un programa de investigación en biotecnología aplicada al mejoramiento genético del café, y de otra, informar sobre los principales avances al respecto en los últimos 10 años. Me ha parecido conveniente referir estas experiencias desde mi punto de vista de fitomejorador convencional, poseedor solamente de una visión general de las bondades y limitaciones actuales de la biotecnología.

ALGUNAS CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA CAFICULTURA COLOMBIANA.

En Colombia se cultivan unas 900.000 hectáreas con las variedades de *C. arabica* Caturra, Típica y Colombia, reconocidas por sus buenas características agronómicas y excelente calidad de la bebida. La producción media del país es de 1200 kgr. de café pergamino seco por hectárea y año, cantidad que es 5 veces inferior al potencial productivo de los materiales mejorados, cuando son cultivados con practicas agronómicas apropiadas.

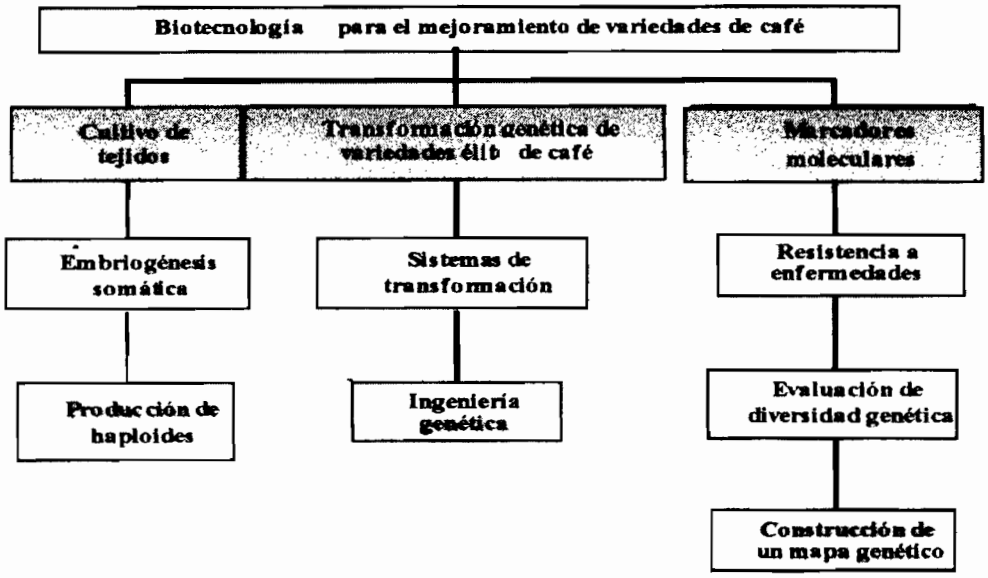
Cerca de 15 patógenos atacan al café, pero solamente uno, el hongo *Hemileia vastatrix*, causante de la roya de la hoja, es limitante porque su efecto reduce la producción en 20 %, aproximadamente. La variedad Colombia, con resistencia a esta enfermedad, fue entregada a los agricultores en 1982, un año antes de la llegada del patógeno al país, y hasta ahora ha sido utilizada exitosamente para su combate (Castillo y Moreno, 1986).

Varias plagas afectan al café, pero solamente la broca (*Hypothenemus hampei*) alcanza dimensiones epidémicas que afectan la cantidad y calidad de la cosecha. Una búsqueda exhaustiva de fuentes de resistencia en el pool genético primario de *C. arabica*, variedades comerciales y algunas especies diploides, se adelanta en Colombia desde hace 7 años, pero hasta el momento no se han encontrado fuentes de interés (Moncada, 1992).

INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA.

El objetivo es desarrollar técnicas de cultivo in vitro y de biología molecular para incorporarlas en el mejoramiento del café, con énfasis en la solución de problemas en los cuales los métodos convencionales no han sido exitosos Para cumplir este objetivo, las actividades se concentran en tres campos principales relacionados con técnicas de cultivo in vitro, con la transformación genética de variedades de café y con el desarrollo de marcadores moleculares (figura 1).

Figura 1. Organización del programa de Biotecnología de CENICAFE.



Cultivo in vitro.

En el café la propagación in vitro tiene varias aplicaciones, pero en el caso de Colombia su utilización principal es para proporcionar tejido embriogénico para la transformación genética. De las técnicas de propagación in vitro disponibles, la embriogénesis somática fue escogida por ser la mas eficiente para producir el tejido embriogénico necesario.

Durante los últimos 10 años CENICAFE ha investigado sobre los factores que afectan la respuesta embriogénica en cada una de las 4 etapas relacionadas con la embriogénesis somática : Inducción, Proliferación, Germinación y Endurecimiento (Aponte y Molina, 1995; Aponte, 1993). Todos estos factores, y sus interacciones, se han estudiado en progenies de Caturra X Híbrido de Timor, poseedoras de resistencia a la roya, que son los materiales de mas interés para el mejoramiento (tabla 1). Solo el 20 % del material probado tiene una capacidad embriogénica alta, cantidad que es insuficiente, porque la meta es obtener materiales transformados, de diferente origen, para conformar variedades compuestas. Actualmente se realizan nuevos experimentos con los genotipos con baja respuesta, aplicando modificaciones recomendadas para materiales recalcitrantes.

Tabla 1. Factores relacionados con la Embriogénesis somática, estudiados en CENICAFE.

Inducción	Proliferación	Germinación	Endurecimiento
Planta donante - Genotipo - Fuente de explante - Estado fisiológico - Remoción mecánica de flores y frutos - Floración - Estratos de la planta Condiciones de crecimiento - Fotoperiodo - Temperatura - Tiempo de subcultivo - Modalidad de cultivo - Selección del tejido durante el subcultivo Medio de cultivo - Sales orgánicas e inorgánicas - Reguladores de crecimiento - Marca de agar	Sincronización - Separación de agregados celulares - Filtración - Densidad de inóculo	Medios de cultivo - Deshidratación osmótica - Niveles de sacarosa - Reguladores hormonales Condiciones de crecimiento - Fotoperiodo	Concentraciones de macro y micronutrientes

Producción de plantas haploides. La justificación principal para la obtención de individuos haploides es disponer, para los trabajos de mejoramiento, de plantas completamente homocigotas, en un periodo relativamente corto. Plantas haploides se han obtenido por métodos in vivo o in vitro en diferentes paises (Couturon, 1982; Carneiro, 1997; Duffor et al, 1995; Ascanio y Arcia, 1994). Sin embargo, la poca reproducibilidad y la baja eficiencia de los métodos han hecho que la tecnología de los haploides sea poco utilizada en programas de mejoramiento convencional

En nuestro laboratorio se han reproducido diferentes protocolos de cultivo de anteras y se han podido regenerar varias plantas de Caturra y de otros genotipos, las cuales, sin embargo, no han sido haploides (Herrera y Moreno, 1995). Dada la baja frecuencia de inducción de tejido embriogénico, en CENICAFÉ se hizo un seguimiento histológico del desarrollo de las anteras en cultivo, comprobándose que el tejido formado era de origen somático (Herrera, 1998).

El cultivo de microsporas también se ha intentado en CENICAFE, pero hasta el momento solo ha sido posible inducir la formación de pequeñas microcolonias de células en división, pero con frecuencias muy bajas, inferiores al 1 %. Actualmente se evalúa la respuesta de las microsporas a tratamientos con colchicina, y los resultados preliminares son promisorios.

Estos resultados permiten concluir que los métodos utilizados para inducir la androgénesis en anteras de café y para el cultivo de microsporas, todavía son deficientes y por tanto, se requiere explorar nuevas estrategias.

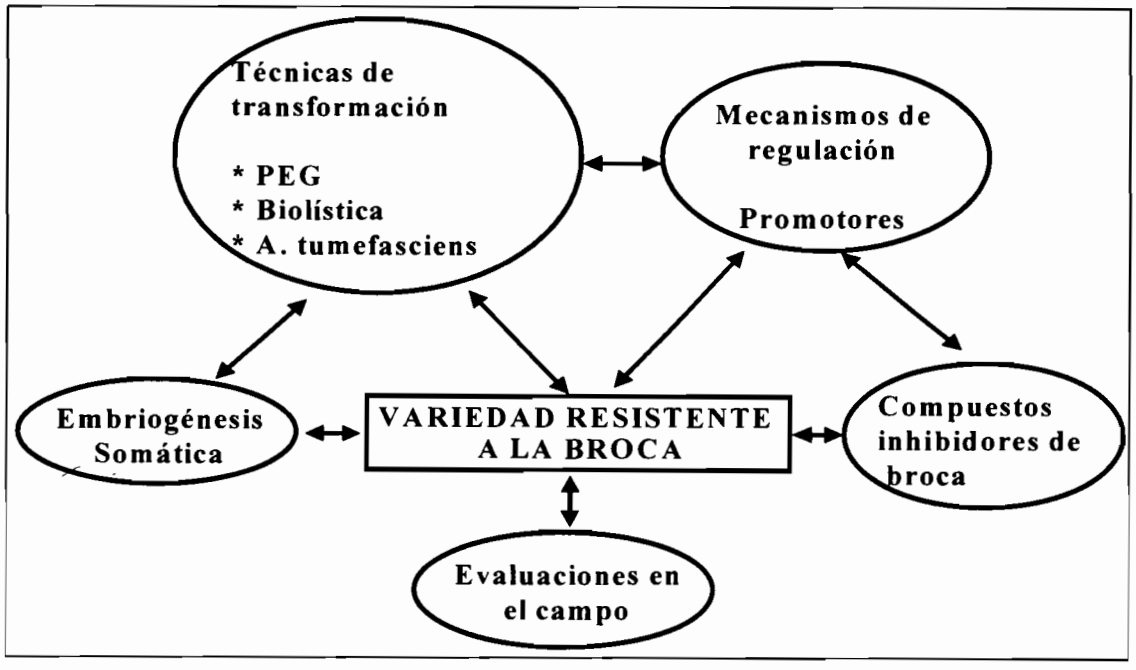
Transformación genética de variedades elite de café.

La introducción al café de genes heterólogos que inhiban el desarrollo de la broca es el objetivo primordial de las investigaciones adelantadas en CENICAFE en el campo de la transformación genética. La ausencia de fuentes de resistencia de interés dentro del germoplasma disponible, las perdidas económicas que ocasiona la plaga y la dificultad para su control, justifican plenamente los esfuerzos que se hagan en este sentido.

El desarrollo de una variedad mejorada, con resistencia a la broca, depende de los avances que se logren en diferentes etapas que, en su conjunto, constituyen el plan de investigación. Estas etapas se representan esquemáticamente en la figura 2 y a ellas nos referiremos a continuación.

Técnicas de regeneración. Disponer de un sistema de regeneración eficiente es indispensable para la transformación genética. Como vimos, CENICAFE dispone ya de la metodología apropiada

Fig. 2 Esquema para desarollo de una variedad de café transgénica, con resistencia a broca



Técnicas de transformación. Gracias a acuerdos cooperativos celebrados con las Universidades de Cornell y Purdue, de los Estados Unidos, CENICAFE ha evaluado sistemas directos e indirectos de introducción del DNA. En el primer caso se ha ensayado la transferencia por medios químicos, como el polietilen glicol y por medios físicos, como el bombardeo con partículas, o biolística. En el segundo caso se ha utilizado el vector natural Agrobacterium tumefaciens. El adiestramiento recibido en esas técnicas ha hecho posible que actualmente se ejecuten directamente en CENICAFE.

En todos los sistemas ensayados ha habido avances importantes, pero parciales. Por ejemplo, CENICAFE cuenta con la metodología para el cultivo in vitro de protoplastos y para la regeneración de plántulas a partir de estos (Acuña y de Peña, 1991), pero en el caso de la transformación de los protoplastos por medio de PEG, solo se ha podido obtener altos niveles de actividad estable de genes marcadores, como GUS, en tejido embriogénico y en callos (de Peña, 1995). No se han recuperado plántulas a partir de los callos transformados, posiblemente por una baja capacidad de regeneración del genotipo empleado, después de transformado, tal como ha ocurrido en otras especies.

En el caso del bombardeo de partículas, los aspectos destacables son, por una parte, el uso de esta metodología para comprobar la expresión transitoria de promotores de interés. Cuatro promotores se han probado con éxito con esta técnica (35 S, Doble 35 S, PAL y Alfa-tubulina). Hay que destacar también el uso de esta técnica para demostrar la expresión estable de genes de interés. Plántulas transformadas con uno de estos genes están creciendo en medio selectivo para kanamicina, aunque las pruebas definitivas de la transformación no se han realizado.

En el caso de Agrobacteriun, se ha comprobado el alto poder infectivo de 3 cepas desarmadas, actuando sobre tejido embriogénico. Los trabajos en este campo apenas se están iniciando; por ser una técnica de transformación limpia que permite solo la introducción en el tejido del segmento de DNA deseado, la hacen muy atractiva para el futuro.

Mecanismos de regulación de genes de interés. En el mercado están disponibles diferentes promotores, útiles para regular la expresión de los genes heterólogos. Sin embargo, CENICAFE tiene interés en desarrollar sus propios promotores, principalmente por dos razones. En primer lugar, porque se necesita que los genes de interés se expresen en el sitio de la planta frecuentado por la broca, es decir, en el endosperma del grano de café, en un momento que coincida con el ataque del insecto. Un promotor que reúna estas características debe ser especifico y como tal, no se encuentra entre los disponibles. En segundo lugar, por las restricciones que impone la legislación sobre propiedad intelectual, que protegen los promotores disponibles en el mercado y crean dependencia de sus poseedores.

Cenicafé cuenta con 3 promotores aislados de café. El primero es el promotor que regula temporal y espacialmente la expresión de la Arabicina, la principal proteína de reserva del endospermo de café, descrita por primera vez por Acuña y otros (1999). Se trata de un promotor especifico para café, cuya acción puede facilitar enormemente el uso de genes heterólogos en el caso de la resistencia a la broca. Actualmente se evalúa la capacidad de este promotor para regular la expresión transitoria y estable de genes relacionados con compuestos inhibidores de este insecto.

El segundo es el promotor que regula la expresión del gen constitutivo de Alfa-tubulina en café. Este promotor ya demostró ser capaz de regular la expresión del gen GUS en tejido embriogénico y en plántulas de café provenientes de embriogénesis somática. El tercero es un promotor inducible que regula la expresión de Fenil alanina amonioliasa, PAL, enzima involucrada en mecanismos de defensa (Gaitán y Aldwinkle, 1997).

Los 3 promotores mencionados se encuentran listos para probar la expresión de genes heterólogos que controlen la formación de compuestos inhibidores de la broca.

Identificación de genes que controlan compuestos inhibidores de la broca. En lo referente a la búsqueda de genes heterólogos que confieran algún nivel de resistencia a la broca, se han realizado investigaciones en varios campos. Uno de estos consiste en la evaluación, en dietas artificiales, del efecto de diferentes extractos sobre la broca. Los mejores resultados se obtuvieron con extractos de cultivos de Streptomyces con actividad quitinolítica. Después de realizar la ingeniería genética de dos de estos genes que tienen esa actividad, se procedió a introducirlos en vectores de expresión en plantas de tomate, manzano y café. Hasta el momento solo las plantas de tomate han sido evaluadas en

invernadero, y se ha observado un efecto detrimental sobre el insecto *Trichoplusia ni.* (Broadway et al, 1998).

También se ha trabajado en la búsqueda y evaluación rápida de fuentes vegetales que contienen inhibidores de amilasas que afectan la broca, con resultados muy promisorios (Valencia, 1996). Finalmente, como parte de un acuerdo con la Universidad de Maryland, se están buscando genes de interés a partir de hongos entomopatógenos.

El aspecto para destacar es que se está reuniendo un grupo de genes activos contra la broca, que usados con los promotores antes mencionados, facilitaran la generación de poblaciones de plantas con combinaciones de genes de resistencia contra este insecto.

Prueba de los materiales mejorados transformados. Como se ha visto, se han hecho avances importantes, pero aun no sabemos que tan cerca o lejos estamos de la meta final. Cuando se alcance, la variedad transformada deberá ser evaluada rigurosamente por mejoradores, entomólogos y biólogos moleculares, para juzgar sus cualidades respecto a aspectos críticos como los siguientes :

Los genes heterólogos introducidos afectan otras características de interés ? Cómo se comporta la descendencia de las plantas transgénicas ? Cómo se comporta la resistencia a la broca en diferentes ambientes ? ¿Cómo se afecta la población del insecto frente a materiales resistentes? Esperamos tener la respuesta cuando llegue el momento.

Utilización de marcadores moleculares.

De las herramientas que ofrece la Biotecnología, los marcadores moleculares son quizás los que mas aplicaciones tienen en un programa de mejoramiento genético. En CENICAFE los trabajos en este campo son muy recientes, pero hay algunos resultados. El objetivo principal es identificar genes responsables de caracteres de interés, que sirvan para agilizar la selección, y además, que puedan ser utilizados en investigaciones relacionadas con el conocimiento de la diversidad genética y a mas largo plazo, con la construcción de un mapa genético de la especie C. arabica.

Los genes de interés escogidos son los que controlan la resistencia a la enfermedad de los frutos, o CBD, causada (*Colletotrichum kahawe*), y los que gobiernan la resistencia a la roya del cafeto. Los genes responsables de alta producción, que en varios cultivos se están seleccionando con la metodología conocida como QTL, no son prioritarios en nuestro caso, porque un aumento considerable de la producción nacional puede ser obtenido usando vías mas expeditas, como por ejemplo, aprovechando mejor el potencial productivo de los materiales mejorados.

Respecto a los marcadores relacionados con la resistencia al CBD, en CENICAFE hemos separado materiales resistentes y susceptibles, inoculados en los laboratorios del CIFC, en Portugal, usando dos de los marcadores RAPD desarrollados por Agwanda y Lashermes en Francia (1997). En otros materiales, también inoculados en el CIFC, los resultados no han sido igualmente satisfactorios, por lo que ahora estamos desarrollando marcadores SCAR a partir de los RAPD disponibles, con el objetivo de lograr una metodología que discrimine los materiales mas eficientemente.

En el caso de la roya del cafeto, estamos interesados en identificar marcadores relacionados con la resistencia incompleta, para lo cual se adelanta un proyecto usando el Análisis de Segregantes Agrupados o BSA (Bulk Segregant Analysis), pero todavía no hay resultados.

Los primeros trabajos sobre diversidad genética los hemos hecho usando marcadores RAPD sobre materiales de *C. arabica* recolectados en Etiopía por las misiones de la FAO y de ORSTOM, y sobre las principales variedades americanas. Diez iniciadores (*primers*) ensayados han mostrado algún grado de polimorfismo entre las introducciones etíopes. En las variedades comerciales la variabilidad encontrada es menor (Cristancho, 1998). La colección de germoplasma de CENICAFE, como la de la mayoría de los países occidentales, es rica solamente en introducciones de la especie *C. arabica*, que como es sabido tiene un grado de diversidad reducido. Sin duda, los trabajos relacionados con el polimorfismo avanzarían mas rápidamente si son ejecutados por los países que poseen las colecciones mas diversas, como es el caso de los países africanos.

Finalmente, Cenicafé tiene como meta, a largo plazo, desarrollar un mapa para la especie C. arabica. Sin embargo, en este caso la falta de una población experimental adecuada es una limitación importante. En efecto, es necesario que los parentales utilizados den origen a una segregación importante para las características de interés agronómico, y como vimos, el polimorfismo en los materiales tetraploides es

escaso. Por otra parte, en café el único mapa genético conocido es el desarrollado por los investigadores franceses (Paillard et al, 1996). Sin embargo, es posible que en los materiales utilizados para desarrollar este mapa (dobles haploides de *C. canephora*), no estén presentes características de interés agronómico útiles en el caso de *C. arabica.*

Para tratar de solucionar estos problemas, en CENICAFE estamos desarrollando diferentes poblaciones experimentales, y además, estamos produciendo marcadores de diferente naturaleza. Hasta el momento disponemos de un grupo de marcadores RFLP, RAPD y Microsatélites, que van a comenzar a ser utilizados cuando las poblaciones estén disponibles.

CONCLUSIONES.

La investigación en el campo de la biotecnología es costosa, y por tanto, las prioridades establecidas deben ajustarse muy bien a las necesidades de cada país. Las alianzas entre centros de investigación pueden contribuir a la reducción de los costos.

En CENICAFE ya se encuentran disponibles varias métodos de biotecnología para iniciar su aplicación en el mejoramiento genético del café. La identificación de nuevos genes de interés ayudará a los mejoradores en la selección de genotipos superiores.

La obtención de una variedad transgénica en café todavía esta lejana, al menos en Colombia. Sin embargo, cuando esto se logre, tal variedad deberá satisfacer las exigencias de los caficultores, de los consumidores, del mercado mundial y de la comunidad en general.

BIBLIOGRAFIA

Acuña J. R. and De-Peña, M. 1991. Plant regenration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. Plant Cell Rep. 10: 345-348.

Acuña R., R. Bassüner, V. Beilinson, H. Cortina, G. Cadena, V. Montes, and N. C. Nielsen. 1999. Coffee seeds contain 11S storage proteins. Physiol. Plant. 105: 122-131.

Agwanda C. O., P. Lashermes, P. Trouslot, M. C. Combes and A. Charrier. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. Euphytica 97: 241-248.

Anthony F., B. Bertrand, P. Lashermes , and A. Charrier. 1997. La biologie moléculaire en appui à l'amélioration génétique du caféier Arabica. Plantations, recherche, développement, Novembre-Décembre: 369-377.

Aponte A., M.E. 1993. Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants from crosses of *Coffea arabica* by Timor hybrid. XV Coloquio Científico Internacional sobre Café. ASIC. p. 82-88. Montpellier, Francia.

Aponte A., M.E., and Molina V., D. 1995. Evaluación de genotipos de café por su capacidad embriogénica "in vitro". IV Congreso Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos. Chinchiná, Colombia. p. 120.

Ascanio C. E.,and M. A. Arcia. 1994. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. var. Garnica. Café, cacao Thé, 38(2): 75-79.

Broadway, M. R.; Gongora, C. ; Sanderson, P. J.; Monroy, A.J.; Bennet, C.K.; Warner, B.J. and Hoffmann, P.M. 1998. Novel Chitinolytic enzymes with Biological Activity against herviborous insects. Journal of Chemical ecology, 24, 985-998.

Carneiro, M.F. 1997. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. Euphytica, 96: 167-172.

Castillo Z., J., and Moreno R., G. 1988. La variedad colombia: selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. Cenicafé. Chinchiná, Colombia. 171 p.

Couturon E. 1982. Obtention d'haploides spontanés de *Coffea canephora* Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. Café, Cacao, Thé Vo XXVI n:3:155-160.

Cristancho, M.A. 1998. Informe Annual de Labores. CENICAFE. Chinchiná, Colombia.

Dufour M., M. Jimenez, and D. Duris. 1995. Haplomethods: factors controlling callus obtention on *Coffea arabica* anthers. XVI Coloquio Científico Internacional sobre Café. ASIC. p. 765-770. Kyoto, Japón.

Gaitán, A.L., and H. Aldwinckle. 1997. Cloning and evaluation of gene promoters in *Coffea arabica*. Phytopathology 87: S31.

Herrera, J.C. 1998. Informe Annual de Labores. CENICAFE, Chinchiná, Colombia.

Herrera P., J.C., and Moreno R., G. 1995. Estudio de algunos factores que afectan el desarrollo "in vitro" de microsporas aisladas de café (*Coffea arabica* L.).

IV Congreso Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos. Chinchiná, Colombia. p. 130.

Moncada, M. del P.1992. Búsqueda de fuentes de resistencia genética a la broca *Hypothenemus*

hampei, en germoplasma de café (Proyecto MEG.08). Cenicafé. Chinchiná, Colombia.

Moreno R, G. 1994. Contribución del mejoramiento genético al desarrollo de la caficultura colombiana. Innovación y Ciencia, 3(2): 1-6.

Paillard M., P. Lashermes, and V. Pétiard. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet., 93: 41-47.

Pétiard V., H. Bollon, J.P. Ducos, B. Florin, M. Paillard, J. Spiral, and A. Zamarripa. 1993. Biotechnologies appliquées au caféier. XV Coloquio Científico Internacional sobre Café. ASIC. p. 56-66. Montpellier, Francia.

Peña, M. de. 1995. Development of a stable transformation procedure for protoplast of *Coffea arabica* cv. Colombia. Thesis Philosophy Doctor. West, la Fallette, IN. EEUU. 76p.

Valencia, A. 1996. Evaluación de inhibidores de amilasas y proteasas y estudio de las enzimas digestivas de la broca del café (Hipothenemus hampei). Proyecto de investigación ENT-1000, CENICAFE, Chinchiná, Colombia.

AVANÇOS NA OBTENÇÃO DE DI-HAPLOÓIDES EM CULTIVARES DE *Coffee arabica L.*

Maria Filomena Carneiro

Centro de Investigação das ferrugens do Cafeeiro Quinta do Marquês, 2780- Oeiras, Portugal

INTRODUÇÃO

Entre as mais de 70 espécies do gênero *Coffea* existentes, apenas duas, *Coffea arabica e a Coffea canephora* são cultivadas nos diferentes países produtores de café.

Coffea arabica são tetraplóide (2x= 44) e autogâmica e todas as outras incluindo a espécie *Coffea canephora* são diploídes (2x=22). O ciclo de vida do cafeeiro é muito longo e qualquer programa de melhoramento com o objetivo de obter uma cultivar nova requer longos períodos de tempo para a seleção que podem ir até 30 anos. As técnicas modernas da cultura de células e de tecidos vegetais permitem reduzir aqueles períodos longos de seleção e ultrapassar as dificuldades dum programa de melhoramento tradicional.

A androgênese é uma técnica que permite obter linhas homozigóticas de cultivares novas em curto espaço de tempo, facio este que pode encurtar drasticamente um programa de melhoramento possibilitando a introdução e manipulação de espécies novas. Cada antera de cafeeiro tem cerca de 2 000 40 000 micrósporos e cada um deles pode dar uma nova combinação durante a meiose.

A maior vantagem dos haplóides é o fato de eles serem usados para produzir com rapidez linhas homozigóticas. Como por definição os haploídes têm apenas um número básico de cromossomas, a duplicação de cromossomas desses indivíduos ressalta numa fixação instantânea da linha. Este fato minimiza o tempo necessário para obtenção de homozigocidade e consequentemente evita problemas de amostragem encontrados quando a testagem é feita numa geração precoce.

Em cultura, os micrósporos seguem diferentes vias de androgénese que permitem a formação de haploides quer diretamente por embriogénese ou indiretamente através de formação de calo. Do ponto de vista do genetecista a formação de embriões diretamente a partir de grãos de póloen são preferidos a formação indireta de embriões via solo.

Teoricamente, por cultura de anther/micrósporo, pode ser produzido um elevado n^0 de plantas haplóides.

Infelizmente, o processo na cultura de anteras/ micrósporo no cafeeiro tem sido lento.

Apesar de referências a cultura de antera/pólen se reportarem a 1973 (simp et al. 1973), apenas em 1987 foram apresentados resultados referindo a regeneração de plantas (Ascanio & Arcia 1987; Carneiro, 1987).

A nossa intervenção fundamenta-se na apresentação dos resultados obtidos nesta área no CIFC. o trabalho desenvolvido teve como principal objetivos otimizar as espécies de obtenção de plantas di-haplódes em cultivares comerciais e transferir a tecnologia para as cultivares Catimor e Sachimor a fim de obter cultivares com resistência às principais doenças do cafeeiro, nomeadamente à ferrugem alaranjada das folhas, Hemileia vastratix e a antracnose dos frutos verdes, *Coffetrochium kakawae.*

Todas as experiências foram realizadas em diferentes progenie de cvs Catuai e Catimor. Para determinar o estádio de desenvolvimento na altura de colocação em cultura e a resposta gametolifica dos micrósporos durante a cultura foram utilizados dois métodos: Carmim acética a 2% e DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindole 2 HCL (Schweizer and Nagi, 1976, Detchepare et al, 1989). Para verificar a viabilidade dos micrósporos na altura da imaculação e durante a cultura, foi utilizado o teste de Diacetato de Fluoresceina (FDA)(Widholm, 1972).

ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO DAS ANTERAS

Reveste-se de grande importância a seleção de botões florais no estádio de desenvolvimento óptimo. Contudo estes estádios são difíceis de identificar em rotina.

Embora o estádio óptimo para colocar as anteras ou micrósporos isolados seja a 1 mitose dos grãos de pólen, este estádio depende muito das espécies. Por exemplo, no tabaco é a 1 mitose do grão de pólen enquanto que nos cereais e na *Brassica* por exemplo é de pouco antes enquanto o miscróporo é uninucleado (Powell 1990). Este fato foi já salientado por vários autores, nomeadamente por Sunderland (1974). Nitsch (1974 a,b; 1977; 1983). Dunwell (1976) e o Carneiro (1987). Contudo, um pequeno período de tempo a volta da 1^0 mitose parece o momento ideal para induzir divisão anormal dos micrósporos para seguir a via esporofítica. O tratamento pelo frio parece aumentar a divisão anormal dos micrósporos

(Nitsch et Norreel 1973: Picard et de Buyser, 1975; *Corduan* et Spix, 1975). Outros fatores que condicionam uma ambriogénese é a composição do meio de cultura, diferentes hidratos de carbono em diferentes concentrações, o tratamento pelo calor, acompanhado ou não de centrifugação. Todos os trabalhos desenvolvidos por nós suportam estes conceitos prévios.

CULTURA DE MICRÓSPOROS

As primeiras experiências forma realizadas com a cv Catuai (CIFC 8223/205) e para a extração de micrósporos foram utilizadas duas técnicas de Nistch (1974 a,b; 1977) e a técnica de ' Shed pollen' de Sunderland (1974, 1979).

Os micrósporos foram cultivados em diferentes meios de cultura Nistch(1974 a,b; 1977) fazendo variar as concentrações de reguladores de crescimento, concentrações de sacarose, vitaminas e aminoácidos, L-glutamine e L- serina.

As anteras isolodas em n^0 de 50 correspondendo a cerca de 10 botões florais foram colocadas em 5 ml de meio basal Nistch (1974b; 1977) e foram mantidas em condições de escuridão durante 0, 24, 48, 72 e 96 h. Ao fim destes períodos de indução os micrósporos forma extraídos usando a técnica de Nistch e foram cultivados em diferentes meios de cultura acima referidos.

Quando da inoculação quase todos os micrósporos se encontravam no estágio de 1 mitose apresentando dois núcleos . Durante a cultura, os micrósporos apresentaram comportamentos diferentes, nomeadamente : a-) alguns apresentaram divisões repetidas sem divisão da célula originando uma estrutura multicelular que acabou por abortar; b-) outros micrósporos seguiram uma divisão nuclear seguida de divisão celular originando um callus e finalmente alguns micrósporos apresentaram divisão originando duas células , as ' células filhas' (células androgénicas) que seguiram uma divisão igual e originaram os pró-embriões. Estes pró-embriões globulares passaram por outras fases da germinação dos embriões, i.e, embriões na fase globular, coração, torpedo e com folhas cotiledonares. Este comportamento foi verificado em todos os meios de cultura ensaiados exceto no meio que não continha reguladores de crescimento. (Carneiro, 1987).

Os sinais de embriogénese desapareceram em amostras onde se utilizaram períodos indutivos superiores a 72 ou 96 h. Experiências realizadas ulteriormente permitiram concluir que os períodos indutivos superiores a 96 h eram letais e conduziram à morte das anteras e consequentemente dos micrósporos. Verificou-se também que os meios de cultura tinham um papel importante no desenvolvimento de embriões e que este último apenas tinha lugar na presença dos aminoácidos, a vitamina mio-inositol e dos reguladores de crescimento AIA e ZEA.

Numa outra experiência, foram cultivados botões florais da cv Catuai (CIFC 8223/50) em 7 diferentes estádios de desenvolvimento: pré-meiose, 1^0 meiose, 2^0 meiose, tétrada, tétrada de micrósporos, micrósporos isolados e grãos de pólen maturos em meio MS (1962), suplementados com BAP, AIA, mio-inositol, L – Glutamina, e L – serina.

Os micrósporos foram isoladospela técnica de Nistch e cultivados em meio liquido estacionário. Neste meio, foi possível induzir a embriogénese e isolar todas as suas fases. O meio de cultura teve as necessárias alterações de acordo com a fase da embriogénese.

Dos 7 diferentes estádios de desenvolvimento ensaiados, os melhores resultados foram conseguidos quando as anteras se encontravam na fase pós-meiótica e antes da maturação dos grãos de pólen i.e, nas fases de tétrada, tétrada de micrósporos e micrósporos isolados.

No que se refere ao tratamento pelo frio o pré-tratamento a $4\text{-}6^0$ durante 48 h dado aos botões florais de cv Catuaí (CIFC 8223/50), aumentou a divisão anormal dos micrósporos.

No entanto, as percentagens de micrósporos seguindo isolados a partir dos botões não foram muito diferentes das percentagens obtidas pelos micrósporos isolados a partir dos botões não tratados, i.e, colocados a temperatura ambiente . Este fato sugere que a micrósporogénese dos botões colocados no frio se desenvolve simultaneamente com a dos botões colocados nas condições normais de ambiente.

Os embriões apresentaram um aspecto vegetativo fraco e a conversão em plântuls foi muito difícil.

A composição dos meios de cultura, é outro fator de importância fundamental, nomeadamente as concentrações dos reguladores de crescimento. Os aminoacidos L – glutamina e L – serina parecem desempenhar um papel importante na percentagem dos micrósporos seguindo embriogénese.

Foram também estudadas as influências do pré-tratamento pelo calor (30^0 C) durante 0, 24 e 48 h combinado com centrifugação dos botões florais antes da extração dos micrósporos na cv catimor (CIFC 7963/2) Os micrósporos foram cultivados no meio MS suplementado com BAP e ANA. Verificou-se que os micrósporos resultantes do tratamento dado durante 24 h deram origem a embriões e microcalos ao fim de 13 dias sem cultura.

CULTURA DE ANTERAS

As anteras pertencentes à cv Catuaí (CIFC 8223/61-124) foram cultivadas no meio de cultura MS suplementados com tiamina – HCL, mio-inositol e diferentes combinações de auxinas: 2. 4 –D, ANA, AIB e AIA. A composição do meio de cultura foi modificada durante a cultura de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento das anteras. As culturas foram cultivadas no escuro e em condições de luz. Para a proliferação de *calli* indução de rebentos/embriões, as culturas foram incubadas à luz.

Tal como na cultura de micrósporos foram ensaiados sete diferentes estádios de desenvolvimento de anteras e o efeito do pré-tratamento pelo frio, 4-6^0 durante 0,24, e 48 h. foram avaliadas as percentagens de fenolização, n^0 de anteras calogénicas, peso fresco do calo e a qualidade do calo.

As anteras cultivadas de ação da auxinas; 2,4 – D, ANA, AIB e AIA. A percentagem de oxidação foi baixa nas 1^0 semanas da cultura. Todas as anteras cultivadas no meio MS sem reguladores de crescimento não originaram calo e acabaram por morrer. A 1^0 subcultura teve lugar 12 semanas mais tarde, exceto nas anteras crescendo no meio suplementado com AIB (apenas numa placa) que originou um calo embriogénico sem mudar de meio de cultura. Foi observando um calo embriogénico emergindo das anteras apresentando uma bem desenvolvida plântula

Foram também avaliadas os pesos frescos dos calos produzidos usando duas concentrações (2 e 3 mgl $^{-1}$) de 2,4 – D e de ANA. Quando se estudou a cv Catuaí (CIFC 8223/61-124) verificou-se que os calos produzidos pelas 4 auxinas eram diferentes e variavam e qualidade e em quantidade. Assim, os calos induzidos em 2,4 -D eram friáveis e alguns eram embriogénicos originando embriões e sua conversão em plântulas. ANA, induziu calos esbranquiçados e esponjosos que eram pequenos que os induzidos por 2,4 – D, IBA, induziu calos brancos e nodulares dando origem a um grande n^0 de embriões.

A densidade de calos foi elevada no meio suplementado com 2,4 – D. Em cada tratamento quer em cv Catuaí quer em cv Catimor, as 20 anteras originaram calos brancos e friáveis. No que se refere a cv Catimor (CIFC 7963/212) observaram-se diferentes tipos de calos em função das auxinas usadas Estudo da estabilidade citológica em plantas regeneradas a partir de uma embriogénese repetitiva ou recorrente.

Anteras pertencentes a botões florais de cv Catuaí (CIFC 8223/61-124) em 7 diferentes estádios de desenvolvimento foram cultivados no meio MS suplementado com tiamina-HCL. Mio-inositol, cisteina-HCL, sacarose 40 g/l e diferentes combinações e concentrações de 2,4 – D, ANA, AIB, AIA, BAP e 2iP.

Anteras crescendo no meio de cultura suplementado com AIB originaram um calo embriogénico nodular. Este calo iniciou uma embriogénese secundária ou adventícia e a conversão em plantas teve lugar em 6 meses do meio de conversão. As plantas foram avaliadas para o nível da plóidia usando a técnica de contagem de cloroplastos nas células guarda do estoma. Foram estudadas 167 plantas. Estas foram divididas em 4 grupos. O primeiro grupo constituído por 3 plantas (1,796%) apresentaram 8-10 cloroplastos foram consideradas como sendo n=2x planta haplóide (di-haplóide) em comparação com o n^0 de cloroplastos observados numa polanta haplóide que é de 8,3±1,2 cloroplastos que consideramos como sendo uma planta control ou standard. O segundo grupo de plantas apresentou 14-16 cloroplastos (82,030%) e foram considerados como sendo plantas tetraplóides em comparação com o n^0 13,9±1,8 de cloroplastos por um par de células guarda do estoma de uma planta tetraplóides(2n=4x)

Os dois outros grupos de plantas apresentaram 5-7 (4,191%) e 16-20 (11,976%) n^0 de cloroplastos em cada par de células guarda dos estomas. Estes dois grupos precisam de um estudo mais detalhado para se definir o grau de ploidia, provavelmente o 1^0 será um aneuplóide e o 2^0 um poliplóide.

Quer o método de contagem de cloroplastos nas células guardando estoma quer o método convencional de contagem de n^0 de cromossomas nas células meristemáticas são métodos lentos e de baixo grau de acurácia. Qualquer que seja o objetivo da experiência, as plantas com o desejado grau de ploidia pode ser imediatamente selecionado após a transferência para o meio de conversão ou logo após a transplantação para o solo.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

São conhecidas há muito tempos, no Reino Vegetal, a ocorrência natural de haplóides.

Quando se verificou que ou duplos haplóides eram de grande importância para o uso do melhorador, verificou-se que estas plantas não se encontravam disponíveis para a maioria de culturas e além disso não existiam meios para produzir.

Guha e Maheshwari (1964) conseguiu, com sucesso, obter pela primeira vez embriões cultivando anteras de *Datura innoxia*. Usando esta

aproximação, foram obtidos embriões quer cultivando anteras ou micrósporos num grande n^0 de espécies e em alguns casos provou-se possível regenerar plantas a partir destes embriões.

Apesar deste sucesso, a obtenção de linhas haplóides continuam difíceis de produzir para culturas importantes e por esta razão a investigação celular e molecular tem-se concentrados nas primeiras fases da embriogénese dos micrósporos.

Os estádios mais precoces da embriogénese na *Brassica* demostraram envolver uma 1 divisão pós-meiótica simétrica do que um I divisão assimétrica do pólen (Pechan and Keller 1988, Zaki and Dickinson 1990) Esta falta de assimetria foi acompanhada pela formação de uma parede-tipo-esporofitica, acumulação de amido e curiosamente, a síntese de proteínas relacionadas com stress, semelhantes a s encontradas após um choque por calor (Dickinson, 1992). De acordo com Benito Moreno e colaboradores (1988) há também dados na *Nicotiana* que indicam que o desenvolvimento pode ser dirigido numa via esporofitica ou gametofitica de acordo dom a composição do meio de cultura.

No que se refere ao cafeeiro, os trabalhos de Sharp et al. (1973) e Monaco et al.
referem apenas a formação de calos e a um pequeno crescimento de um micrósporo.

Na década de 80, surgem os primeiros trabalhos em que Carneiro (1987) refere a indução de embriogénese em 40-50% de micrósporos de cv Catuai e Ascanio e Arcia (1987) também pela primeira vez apresentam resultados surpreendentes de regeneração de plantas
haplóides de *Coffea arabica* cv Garnica. Em sucessivos trabalhos foram referidas indução de embriogénese direta a partir de micrósporos e indução de embriogénese indireta seguida de produção de plantas' prováveis di-haplóides' por cultura de anteras. (Carneiro, 1991; Carneiro, 1992; Carneiro,1993; Carneiro, 1995 a,b; Carneiro, 1997b).

Existem várias vias para aumentar a produção de haplóides , nomeadamente o tratamento pelo frio, adição de carvão ativado e particularmente o uso de culturas de micrósporos isolados em meios líquidos estacionários e com agitação
(Sunderland, 1974). Este último procedimento parece ser uma muito importante via de androgénese que permite a obtenção de elevados níveis de embriões haplóides. Contudo há outros importantes fatores que parecem ter um papel determinante na indução e aumento de androgénese, tais como estádio de desenvolvimento da antera quando da inoculação ou colocação em cultura e a
composição do meio de cultura. Muitos autores têm salientados estes fatores e as experiências realizadas por nós, suportam estes conceitos prévios. Assim, o estádio uninucleado do micrósporo na altura da inoculação parece ser crucial para mudar a via normal de desenvolvimento do grão do pólen para uma via anormal que dá origem a formação de embriões ou calo. A I mitose é um importante momento para induzir divisão anormal dos micrósporos no sentido de embriogénese .

Dos setes estádios de desenvolvimento da antera estudados, em diferentes progenie de cvs Catuaí e Catimor concluímos que os melhores resultados foram obtidos quando as anteras se encontravam no estádios pós-meiótico e antes da maturação do grãos de pólen.

O pré-tratamento pelo frio de 48 h a 4-6^0 C dado aos botões florais aumentou a divisão anormal dos micrósporos no sentido da via esporofitica. No que se refere à importância da composição do meio de cultura, os resultados evidenciam a importância dos reguladores de crescimento e das duas concentrações.

aminoácidos L – glutamina e L – serina, quando foram utilizados no meio líquido estacionário na cultura de micrósporos, demonstraram ter um papel importante no aumento de androgénese. Entre os reguladores de crescimento a combinação de BAP com AIB mostrou ser a mais eficaz quer quando foram utilizados anteras quer micrósporos isolados independentemente das cultivares usadas.

Os resultados apresentados são bastantes promissores e constituem um incentivo para a prossecução de estudos relacionados com a androgénese do cafeeiro, nomeadamente em cultivares Catimor e Sachimor, resistentes às principais doenças do cafeeiro e em algumas progênies que apresentam simultaneamente resistência á ferrugem alaranjada e a antracnose do cafeeiro

CUSTO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE CLONAGEM

Maro R. Sondahl[1], Clemencia N. Sondahl[1] e Wallace Gonçalves[2]

[1] Fitolink Corp., 6 Edinburgh Lane, Mt. Laurel, NJ 08054 USA. Av.Caramurú, 2100 s/ 804-A Ribeirão Preto, SP 14030-000 Brasil. Tel.-(016) 620-2745 bionova@netsite.com.br
[2] Instituto Agronomico, Caixa Postal 28, CEC, Centro de Café, Campinas, SP 13100-000.

INTRODUÇÃO

Sementes é a forma mais comum de propagação de plantas, e se aplica sempre que a linhagem é homozigota ou a espécie permite o uso de hibridização controlada (sementes híbridas). A propagação vegetativa se aplica quando a espécie não se reproduz por sementes ou não permite a produção comercial de sementes híbridas, utilizando-se neste caso os métodos de **Enraizamento** e **Enxertia**. A **Micropropagação** é utilizada nos seguintes casos: (a) quando existe dificuldade de propagação pelos métodos tradicionais; (b) é essencial iniciar a produção a partir de "plantas sadias" (livres de doenças vasculares e vírus); e (c) existe a necessidade de produzir grandes numeros de mudas em curto tempo. A Micropropagação se baseia nos seguintes métodos de multiplicação *in vitro:* (1) multiplicação de Gemas Axilares; (2) regeneração via Organogese; e regeneração via Embriogenese. A maioria dos protocolos comerciais de micropropagação utilizam a via de multiplicação de gemas axilares preexistentes, em meio semi-sólido (Kurtz et al. 1991). Estes protocolos se caracterizam por três fases, sempre executadas sob condições estéreis (*in vitro)*: **Inoculação** (fase 1), **Multiplicação** (fase 2) e **Crescimento/ Enraizamento** (fase 3). As etapas subsequentes do processo são realizadas sob condições não-estéreis (fora do laboratório) e compreendem as seguintes fases realizadas em estufas ou viveiros: **Endurecimento** (fase 4) e **Crescimento Final** (fase 5). Planta em fase 5 esta pronta para ser transferida para o local de plantio definitivo.

A comercialização de plantas micropropagadas pode ser realizada com mudas na fase 3, 4 ou 5, dependendo das condições do usuário final em completar o desenvolvimento das mudas. O preço final de mudas fase 3 é dependente dos custos de trabalho sob condições estéreis, a alta demanda de mão de obra especializada e dos custo de materiais para preparo dos meios de cultura. A mão de obra é o principal fator de custo na muda fase 3, chegando a representar 60-70% do custo final desta muda, em processos de micropropagação de gemas axilares em meio semi-sólido. As mudas da fase 3 são muito delicadas, pois não tem ainda folhas e raízes fisiologicamente perfeitas. É durante a fase 4 (endurecimento) que as mudas diferenciam folhas com estomas e cutículas normais e produzem abundante raízes. Ao fim desta estádio, as mudas são transferidas para recipientes maiores a fim de permitir um maior desenvolvimento durante a fase 5. Mudas na fase 4 ou 5 são as mais recomendadas para serem comercializadas, ou seja, são os tipos de mudas normalmente entregues ao produtor.

A micropropagação *via* **Organogenese** não tem sido muito utilizada devido a ausência de protocolos específicos, ou suspeita de elevado índice de variação somaclonal. A micropropagação *via* **Embriogenese** vem despertando grande interesse pela sua alta taxa de multiplicação (menor custo unitário) e pela relativa estabilidade das mudas produzidas. Trata-se de um processo altamente interessante para plantas tropicais, que possuem altos níveis de fenois e taninos (dificeis de enraizar), e para espécies perenes, quer sejam de clima tropical ou temperado, plantas frutíferas ou industriais.

Na cultura do café, o método usual de propagação é via sementes. Em caso de café Arabica, espécie de autofecundação, é possível ter plantações homogeneas (com 98% de homozigose) a partir de seis (6) gerações sucessivas de autofecundação, um processo que exige no mínimo 24 anos de trabalho continuo. Em Robusta no entanto, é impossível ter plantas uniformes via sementes porque trata-se de uma espécie de fecundação cruzada. Portanto, em caso de Robusta, grandes ganhos de produção devem ser alcançados quando plantas elites sejam propagadas. Existem clones de Robustas em que é possível a propagação por enraizamento, mas outros clones devem ser propagados por enxertia ou embriogenese somática. A propagação vegetativa de Arabica se justifica para a imediata exploração comercial de híbridos superiores (alta produção, resistência a pragas e doenças, e outras propriedades desejadas). Materiais de Arabica não permitem a propagação por enraizamento em

escala comercial, portanto devem ser aplicados métodos de enxertia ou embriogenese somática.

O uso de métodos de micropropagação em café foi inicialmente descrito para a multiplicação de gemas axilares de ramos ortotrópicos (Custer 1980; Sondahl et al. 1984). Este processo foi utilizado para a micropropagação de clones selecionados de Catimor em CATI, Costa Rica, dentro do Programa "Promocafe", dando origem a uma população de cerca de 10,000 plantas para ensaios de seleção. Este método é mais simples que embriogenese somática, porém muito pouco eficiente, com baixos rendimentos, e elevado custo unitário por muda. Portanto, somente recomendado para certas aplicações de pesquisa, e nunca para propagação comercial de alta escala.

O processo de Embriogenese Somática em café foi inicialmente descrita para Robusta, usando a cultura de ramos ortotrópicos (Staritsky 1970), e para café Arabica a partir de folhas adultas (Sondahl & Sharp 1977). Ligeiras variações nos métodos originalmente descritos foram apresentados por Dublin (1980) e Yasuda (1985), sempre usando meios semi-sólidos. A produção de embriões somáticos em café a partir de explantes de folha ocorre através dois processos: embriogenese de baixa frequência (ou direta) e embriogenese de alta frequencia (ou indireta), qual dá origem a um tecido embriogenico friável (FET). Esta linha de células embriogenicas pode ser isolada, multiplicada e/ou preservada sob congelamento. Acentuado progresso para a utilização comercial de embriogenese somática em café foram dados pelos protocolos em meio liquido utilizando FET em bioreatores de 5 a 7 litros: Zamarripa *et al.* (1991) e Noriega & Sondahl (1993). Estes trabalhos mostraram ser possível a produção de 45,000 a 200,000 embriões por litro de meio. Um sistema simplificado e interessante de propagação de café em meio liquido foi posteriormente apresentado por Berthouly *et al.* (1995), usando recipientes de 500 ml de capacidade sob imersão periódica.

Com a finalidade de avaliar plantas de café derivadas do processo de micropropagação, sob condições de normais de cultivo, foi instalado um ensaio em São Sebastião do Paraíso, MG, Brasil, contendo mudas derivadas de embriões somáticos, provenientes de duas origens: (1) cultivados em meio liquido em bioreatores; e (2) cultivados em meio semi-sólido. Como controle, foram usadas mudas obtidas a partir de sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: Para cultura de tecidos foram usadas folhas adultas de *Coffea arabica* var. Laurina linhagem #2165. Sementes desta mesma linhagem foram germinadas para produção das mudas controle.

Cultura de Tecidos: Explantes foliares foram cultivados conforme o método descrito em Sondahl & Sharp (1977) e tecidos embriogenicos de alta frequencia (FET) foram isolados para multiplicação em meio semi-sólido e meios líquidos. Para a multiplicação em meio liquido foram utilizados dois modelos de bioreatores, um Aplikon de 7 litros e um Ono de 5 litros. A metodologia usada na multiplicação sob sistema líquidos seguiu o processo descrito em Noriega & Sondahl (1993).

Os embriões somáticos obtidos foram germinados em condições assépticas e os plantletes obtidos (fase 3) foram transferidos para tubettes com substrato artificial e levados para endurecimento em estufa (New Jersey, USA), com 50% de luminosidade sob nebulização periódica. As mudas endurecidas (fase 4) foram introduzidas no Brasil via o Serviço de Quarentena do CENARGEN/Embrapa (Brasília, DF). As plantas fase 5 foram levadas para a área experimental em S. S. Paraíso, Minas Gerais para plantio.

Simultaneamente, sementes foram germinadas em areia e transferidas para tubettes de café, usando substrato artificial, sob luz de 50% no inicio e 30% no final do período de crescimento.

Área Experimental: As mudas derivadas da cultura liquida foram identificadas como B1 (mod. Aplikon) e B2 (mod. Ono); as mudas obtidas em meio semi-sólido foram marcadas como TC e as mudas de sementes identificadas como SE. O plantio foi feito em S.S.Paraiso, MG, no período de 2-4 março de 1995 em espaçamento de 2,0 x 1,0 m, utilizando-se 220 plantas de meio liquido, 230 plantas de meio semi-sólido e 500 plantas de sementes. A área experimental teve um total de 35 parcelas, com um numero de 10-45 plantas/parcela, e o plantio das parcelas foi feito em delineamento casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de micropropagação por **Embriogenese Somática** exige inicialmente o isolamento de um "tecido embriogenico" tipo FET, a partir da cultura de folhas das plantas selecionadas. Este tecido FET tem a capacidade

de produzir embriões somáticos, e é multiplicado inicialmente em meio liquido (cultura em suspensão), usando-se frascos erlenmeyer de 250 ml de volume. Em seguida, este tecido embriogenico é inoculado em Bioreator para novos ciclos de multiplicação, e em fase posterior, inicia-se a indução da fase de regeneração de embriões somáticos, e finalmente entra na fase de maturação dos embriões produzidos.

A germinação dos embriões somáticos já é feita fora dos Bioreatores, em meio semi-sólido, ou outro substrato qualquer, normalmente ainda sob condições assépticas. Embriões com cotilédones plenamente desenvolvidos (fase 3) são transferidos para tubettes com substrato artificial e levados para estufa para o endurecimento. Mudas de café derivadas de embriões somáticos que completaram o período de endurecimento (fase 4) foram levadas um local próximo do plantio e deixadas sob condições de viveiro para completar o crescimento final (fase 5), antes de serem levadas ao campo. Este fluxo de produção de mudas de café via a micropropagação, utilizando-se embriões somáticos, em sistemas líquidos em bioreatores, esta ilustrado na Fig 1. processo de estabelecimento do Tecido Embriogenico tipo FET leva cerca de 6 meses e o estabelecimento de suspensões, requer mais 2 meses. As etapas de multiplicação, regeneração e maturação dos embriões dentro de bioreator leva ca. de 3 meses. A germinação feita em condições ideais de luz e temperatura leva 3 meses. As fases de Endurecimento e Crescimento final (fases 4 e 5) exigem ca. 6 meses. Portanto, a primeira produção de mudas micropropagadas de café via embriogenese somática pelo processo acima descrito leva um total de ca. 20 meses. Num 2º ciclo de produção, já existe disponível o tecido embriogenico FET da planta elite selecionada, e portanto a produção de mudas estádio 5, prontas para plantio, demanda um total de 12 meses.

Pela duração das diferentes etapas no fluxo de produção de mudas via a micropropagação por embriões somáticos apresentado acima, nota-se que a necessidade de um planejamento com 1 ano de antecedência para a produção sequencial de mudas, o que é bastante semelhante ao tempo normal de produção de mudas via sementes: 7 meses da floração ao fruto mais 6 meses para germinação e crescimento das mudas em viveiro. Qualquer projeto de propagação com estas técnicas vai exigir ainda 8 meses extras, no início do processo, para o estabelecimento das culturas embriogenicas. No caso de propagação por sementes, se necessita de um mínimo de 3 anos de crescimento da planta para colher as primeiras sementes.

A capacidade de multiplicação via embriões somáticos, em meios líquidos, é muito alta. Por exemplo, se considerarmos uma produção baixa de 50,000 embriões por litro de meio, utilizando-se bioreatores com dois bioreatores de 10 litros, produz-se um total de 1 milhão de embriões em ca. 3 meses. Considerando-se perdas nas fases de germinação e endurecimento em 50%, estima-se uma produção final de cerca de 500,000 mudas/ano, a partir de uma planta híbrida selecionada, ou seja o equivalente para o plantio de 100 ha. Aumentando-se o numero de bioreatores é possível atender a uma demanda maior de plantio no ano 1. A limitação maior no numero final a ser propagado não é na fase de multiplicação dentro da Biofábrica, mas sim nas fases de viveiro e plantio.

A grande vantagem do processo de micropropagação é a capacidade de produção de mudas em alta escala (1 – 10 – 50 milhões) a partir de uma única planta, usando pequenos segmentos de folhas. Portanto, é um processo que permite entrar em produção comercial de "plantas elites" (híbridos) em curto espaço de tempo, e praticamente sem limitações de quantidades iniciais.

Este trabalho apresenta os primeiros dados comparativos do método de micropropagação em café *versus* sementes, em plantas semi-adultas (4 anos) mantidas em condições normais de cultivo. Foram feitas avaliações anuais quanto ao crescimento vegetativo e aspecto morfológico destas plantas de café, a fim de estimar qualquer efeito na qualidade da muda (sementes vs. micropropagação) e a presença ou não de variabilidade. Para avaliação morfológica se utilizou medidas de altura da planta, diâmetro da planta, diâmetro da haste principal e comprimento dos ramos laterais.

Não foi possível detectar nenhuma diferença tanto no crescimento vegetativo das plantas quanto na produção. Os dados da avaliação morfológica realizada após a 2ª colheita (maio/99) são apresentados no Quadro 1. Usando os valores das plantas derivadas de sementes como Controle (100%), comparou-se os parâmetros das mudas derivadas de micropropagação.

MICROPROPAGAÇÃO DE CAFÉ VIA EMBRIÕES SOMÁTICOS

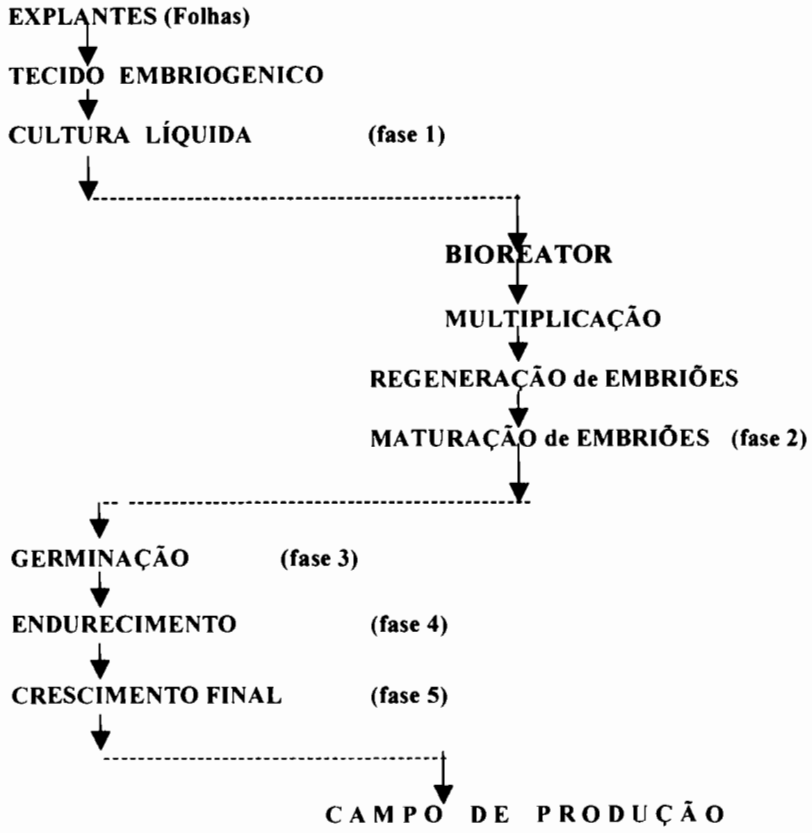


FIGURA 1. FLUXO DE PRODUÇÃO

Quadro 1

Tratamentos	Altura das Plantas	Diametro das Plantas	Diametro do Caule	Comprimento dos Ramos Laterais (cm)					
	(m)	(m)	(cm)	LB 1	BL 2	LB 3	LB 4	LB 5	Media
Media B1	1,8	1,2	5,5	63	66	69	65	62	65
% controle	93	107	106						100
Media B2	1,9	1,2	5,2	71	71	71	67	69	70
% controle	97	108	101						107
Media TC	1,8	1,2	5,1	63	68	63	60	60	63
% controle	94	106	98						96
Media SE	**2,0**	**1,1**	**5,2**	64	68	66	64	64	**65**
Controle									

Para altura, os valores foram um pouco abaixo, mas bem próximos do Controle: B1 (93%), B2 (97%) e TC (94%). Quanto ao diâmetro da planta, as mudas de micropropagação mostraram valores um pouco acima das plantas Controle: B1 (107%), B2 (108%) e TC (106%). Os valores de Controle e os Ramos Laterais foram também muito semelhantes, 96-107% em relação as plantas derivadas de sementes. A Figura 2 ilustra este comportamento morfológico bastante semelhantes entre as plantas após 4 anos de crescimento em condições naturais de cultivo.

A frequencia de tipos anormais (variação somaclonal) foi avaliada em maio/99. Foram observadas as seguintes classes de variação por tratamento:

Plantas de Bioreator = 01 variegada
Plantas Meio Sólido = 02 folhas mais largas
Plantas Sementes = 02 tipo murta
01 tipo angustifolia (folhas estreitas)
01 folhas mais largas

Estes dados acima, mostram que em termos práticos, as plantas derivadas de micropropagação usando-se embriões somáticos mostraram-se idênticas as plantas oriundas de sementes quanto a produção e crescimento vegetativo. Quanto a frequencia de variação, a taxa de plantas anormais foi muito baixa, o que permite o uso em plantios comerciais.

Se expressos em percentagem as frequências acima encontradas, verifica-se:

Plantas de Bioreator = 01/220 = 0,4%
Plantas Meio Sólido = 02/230 = 0,9%
Plantas Sementes = 05/500 =1,0%

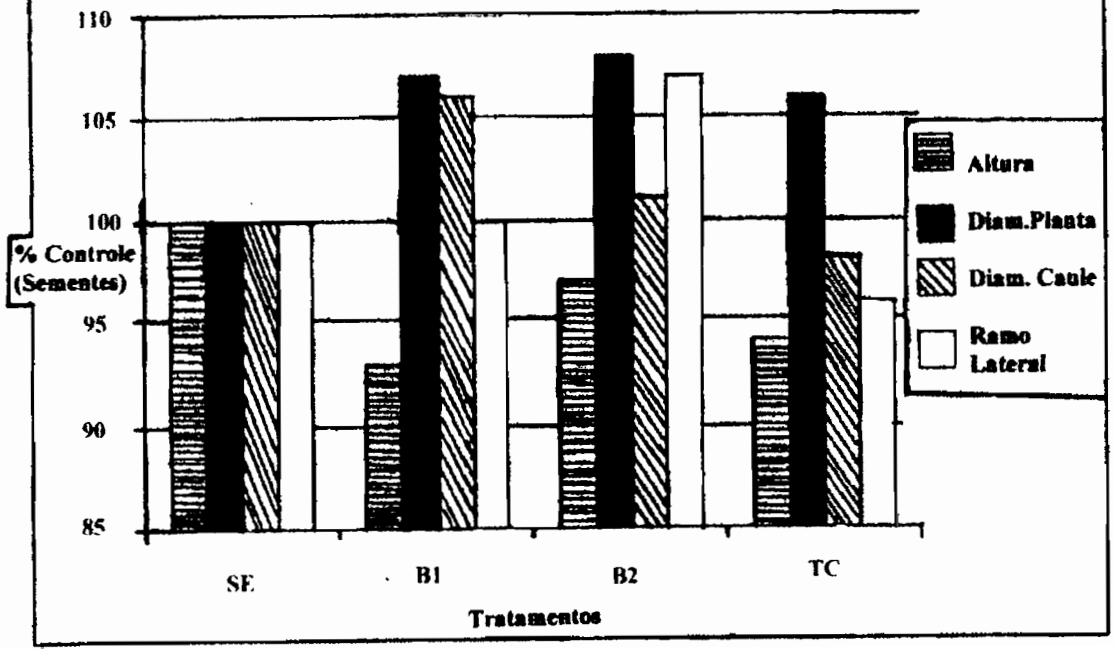
Em realidade, as plantas derivadas de sementes apresentaram uma frequencia de tipos anormais ligeiramente superior que as plantas derivadas de embriões somáticos, demonstrando que existe variabilidade natural para mudas derivadas de embriões sexuais.

Na prática, faz-se uma eliminação no viveiro, antes da operação de plantio, das mudas consideradas fora do padrão morfológico e de crescimento. Esta prática permite a eliminação das plantas anormais e mais fracas.

Existe grande interesse em na utilização da micropropagação em café, mas seu uso em larga escala esta ainda limitado por alguns aspectos importantes: (a) existência de biofábricas especializadas neste processo; (b) a demonstração de qualidade e estabilidade das plantas micropropagadas; e (c) o custo final das mudas derivadas de processo in vitro.

Começam a surgir grupos privados visando a exploração comercial do processo de micropropagação em café. Em Tours, na França, a Companhia Nestle tem um projeto de micropropagação de clones de Robusta selecionados, com campos de demonstração em cinco países (Filipinas, Tailândia, México, Nigéria e Brasil), com uma população teste de 90,000 plantas (Ducos et al. 1999). Os testes de campo nas Filipinas foram os primeiros a serem avaliados, e os resultados iniciais foram muito positivos: alta produção e ausência de variabilidade.

Figura 2.Crescimento Comparativo de Cafeeiros obtidos por micropropagação: Sementes X Bioreactor X Cultura de Tecidos



Neste Pais, estão sendo estabelecidos outros campos de mudas clonadas de Robusta (total 70,000), plantados em áreas comerciais de café, em ensaios comparativos com plantas derivadas de sementes e de enxertia. O custo de produção destas mudas de Robusta micropropagadas foi declarado ser de US$ 169 o milheiro (ou 16.9 centavos de dólares a unidade).

Neste mesmo trabalho, os autores declaram um custo de produção de mudas de Robusta enxertadas igual a US$ 158 o milheiro (Ducos et al. 1999).

Considerando-se uma margem de lucro de 30%, estas plantas micropropagadas poderiam ser vendidas a US$ 220/milheiro, e as plantas enxertadas a US$ 205/milheiro.

Com o aumento da produção, estes custos das plantas micropropagadas devem baixar, pela economia de escala e racionalização de etapas do processo dentro da Biofábrica. No Brasil, existe uma Biofábrica instalada em Ribeirão Preto, SP (BIONOVA) que tem especialistas em micropropagação de café. Existem também laboratórios em instituições governamentais de pesquisa que estão iniciando projectos de produção de mudas de café micropropagadas e a realização de testes comparativos em condições de campo.

O Quadro 2 apresenta uma comparação de preços de mudas de café oriundas de diferentes processos de propagação. O processo de multiplicação *via* **sementes** é o método mais barato, porem este método não permite a propagação de plantas elites segregantes (ou híbridos F1), e portanto restrito a plantas homozigotas (variedades). O processo de sementes em tubettes permite uma maior tecnificação na qualidade das mudas, ganho de 4-6 semanas no tempo total de produção das mudas, e possibilidade de plantio mecanizado.O método de propagação *via* **Enxertia** já vem sendo pratica em escala comercial, com preços que oscilam entre US$ 165-206/ milheiro (R$ 280 – 350). É um método economico e bastante eficiente de propagação, mas requer instalações e pessoal especializado. Para utilizar Robusta como porta-enxerto de Arabica, existe um problema de tempo de maturação de sementes: Arabica (7 meses), Robusta (10 meses). Esta diferença leva a uma redução do índice de germinação das sementes de Arabica e a dificuldade de crescimento das mudas enxertadas durante os meses mais quentes do ano (novembro – março). A localização de viveiros em zonas elevadas, ou a instalação de estufas climatizadas aumenta a eficiência de produção de mudas enxertadas.

O método de micropropagação *via* **Gemas Axilares** é lento, de baixo rendimento em numeros, e com um preço final bastante elevado: US$ 471/milheiro (R$ 800). Este método somente se aplica para estabelecer jardins clonais para fins de pesquisa e manutenção de germoplasma.

O método de micropropagação *via* **Embriogenese Somática** tem grande potencial de aplicação comercial, podendo competir e até superar as vantagens da propagação por enxertia. O custo de mudas de café via embriogenese somática esta na faixa de US$ 176 – 220 / milheiro (R$ 300 – 374). A implantação deste sistema de propagação depende da existência de biofábricas especializadas e da existência de plantas elites ou híbridos de alto valor comercial (em Arabica). No caso de Robusta, a simples seleção de plantas individuais e a multiplicação destes clones traz uma vantagem produtiva imediata.

Se compararmos o custo de uma planta propagada pelo processo de enxertia ou pelo processo de embriogenese somática, verificamos que os preços de mercado são semelhantes: R$ 0,28 – 0,35 (enxerto) e R$ 0,30 – 0,37 (embrião). São portanto processos de resultados e custos semelhantes.

Quadro 2

Valor Estimado por milheiro de mudas		
Metodos de Propagacao	US$	Reais $ (*)
1. SEMENTES		
a) Saquinhos	71	120
b) Tubettes	82	140
2. ENXERTIA		
a) Tubettes	165 - 206	280 – 350
3. MICROPROPAGAÇÃO		
a) Gemas axilares	471	800
b) Embriões somáticos	176 - 220	300 – 374
(*) Valor US$ = 1.7		

A preferencia por um ou outro método vai depender das características de cada projeto, a presença (ou não) de instalações preexistentes, e a disponibilidade de pessoal especializado.

No preço final de uma muda propagada deverá também influir o valor intrínseco do material genético propagado e as condições de oferta e procura. Muito importante nesta atividade, é a capacidade de entrega, em numeros e no prazo, das mudas encomendadas pelo usuário final, evitando-se assim prejuízos de execução de produção em condições de campo.

Considerando o exemplo acima de uma produção igual a 500,000 plantas/ano, o processo de micropropagação via embriões somáticos permite um incremento muito rápido de plantas individuais selecionadas. Este numero por ser aumentado ou reduzido, dependendo do numero (e volume) dos bioreatores colocados em produção. As vantagens da rapidez de propagação traz a oportunidade de negócio para entrar em produção mais cedo. Alem disto, há que considerar o valor intrínseco (genético) superior do material que esta sendo multiplicado (híbridos), e portanto pelas leis de mercado justifica-se um custo mais elevado (2 – 3x maior) das mudas micropropagadas, quando comparadas com o preço das mudas de sementes.

A síntese de híbridos controlados vai trazer uma nova dimensão para a produção de café no mundo, quer para regiões de Arabica ou de Robusta. A micropropagação via embriogenese somática é o único método que vai poder atender a esta inovação tecnológica da cafeicultura do futuro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a contribuição financeira da illycaffe s.p.a., (Trieste, Itália) e Kraft Foods (White Plains, USA) na realização deste trabalho.

LITERATURA

Berthouly, M. , Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C, Teisson, C. 1995. Coffee Micropropagation. *In* 16th Intl. Conf. Coffee Science, Kyoto. ASIC, Paris, pp. 514-519.

Custer, J.B.M. 1980. Clonal propagation of Coffea Arabica L. by nodal culture. In 9th Intl. Coffee Science, London. ASIC, Paris, pp. 589-596.

Dublin, P. 1980. Multiplication vegetative in vitro de l'arabusta. Café Cacao Thé 24(4) 281-289.

Ducos, J.P., Gianforcaro, M., Florin, B., Petiard, V. And Deshayes, A. 1999. Canaphora (Robusta) clones: in vitro somatic embryogenesis. *In* 18th Intl. Conf. Coffee Science, Helsinki. ASIC , Paris, 8 p. (in press)

Kurtz, S.L., Hartman, R.D. and Chu, I.Y.E. 1991. Current methods of commercial micropropagation. *In Scale-up and Automation in Plant Propagation*. I.K. Vasil (ed.), Academic Press, New York, pp. 7-34.

Noriega, C. and Sondahl, M.R. 1993. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. *In 15th Intl. Conference Coffe Science*, Montpellier. ASIC, Paris, pp. 73-81.

Sondahl, M.R., Nakamura, T., Medina, H.P., Carvalho, A. Fazuoli, L.C. and Costa. W.M. 1994. Coffee. *In Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species*. Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. & Yamada, Y. (eds.), Macmillan, N.York, Vol.3, pp.564-590.

Sondahl, M.R. and Sharp, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica* L. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 81: 395-408.

Staristsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neerl. 19(4): 509-514.

Yasuda, T., Fujii, Y., Yamaguchi, R. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell. Physiol. 26(3): 595-597.

Zamarripa, A., Ducos, J.P., Bollon, H., Dufour, M. Petiard, V. 1991. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. Café Cacao Thé 34(4): 233-243.

Tópico: Diversidade
INDIVIDUALMENTE ELAS SÃO
ESPECIAIS.
JUNTAS PODEM SER
ESPETACULARES.
Na natureza, duas coisas não são exatamente iguais. O mesmo se aplica às pessoas. Cada uma é única em conhecimento. Cultura. E experiência. Na Monsanto, acreditamos na riqueza da diversidade. Todos os dias, interagimos com pessoas não só de diferentes origens, mas também de diferentes áreas. Como agricultura, medicina e nutrição. Pois sabemos que, juntando nossas capacidades, podemos criar uma empresa com resultados espetaculares.
MONSANTO
Alimento • Saúde • Esperança™

EFECTO DEL GENOTIPO Y ÉPOCA DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA DE *Coffea arabica* VAR. CATURRA X HÍBRIDO DE TIMOR.

Molina V., D M.; Aponte A., M E.; Cortina G., H., Moreno R., L G.

Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Chinchiná, Caldas, Colombia. AA. 2427 Manizales. Fax: (968) 504723. E-mail: fchcor@cafedecolombia.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática en café como en otros cultivos depende del estado fisiológico del explante (Staristky 1970); tipo de hoja (Rodríguez 1985); tiempo de subcultivo (Michaux-Ferriere et al, 1987); estado fisiológico de las plantas y época del año en que se toman los explantes (Purushotham et al, 1984; Kahia y Owour, 1990); las condiciones del ambiente (Mroginsky y Roca, 1991) y el genotipo (Bieysse et al, 1993; Boxtel y Berthouly 1996; Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996).

El efecto del genotipo en la embriogénesis somática ha sido ampliamente reportado en varias especies como trigo (Mäes et al, 1996); melón (Yavad et al, 1990); alfalfa (Chen et al, 1987); maíz (Close y Ludeman, 1987) y en cítricos (Gmitter y Moore, 1986). En los géneros y especies de herbáceos y plantas leñosas algunos genotipos son recalcitrantes y otros responden bien a la embriogénesis (Gmitter y Moore, 1986; Chen et al, 1987). En cebada Hanzel et al (1985), encontraron también diferencias significativas en el porcentaje embriogénico de los genotipos, lo cual indica que la regeneración esta bajo control genético.

El efecto de la época de recolección del material vegetal ha sido reportado en café por Kahia y Owour (1990); Purushotam et al (1984) y Boxtel y Berthouly et al (1996); en arroz Ma et al (1987) y en avena Rines y McCoy (1981). Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la respuesta de Embriogénesis Somática Directa (ESD) de diferentes genotipos de café y establecer efecto de la época de recolección del material vegetal en la ESD y su interacción con el genotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos. Se utilizaron explantes de 13 árboles (genotipos) pertenecientes a las generaciones F3, F4 y F5 del cruzamiento entre la variedad Caturra y el Híbrido de Timor (Tabla 1).

Manejo de los explantes. Los explantes se recolectaron en diferentes meses de los años 1993, 1994 y 1996. Se usaron hojas jóvenes completamente desarrolladas, provenientes del primero o segundo par de ramas **plagiotrópicas**.

Tabla 1. Genealogía de los genotipos regenerados.

HÍBRIDO	F1	F2	F3	F4	F5
H.3001 CA-CV1 x H de T 1343	**Ar.1322**	**PL.1402**	**A.0192**	**Nr.066**	**BK.045**
					BK.050
					BK.620
				Pr.227	Bl.698
				Sp.092	BK.635
		PL.1372	A.0240	Rs.094	BG.90
			A.0241	Rs.585	Bl.302
		PL.1406	A.0041	Pr.643	Bl.390
	Ar.1324	PL.1000	A.0219		
				Lb.499	BG.060
				Nr.671	Bl.720
			A.0404	Rs.460	BK.500

La desinfección de las hojas se realizó con hipoclorito de sodio comercial (3 y 5%) y tween 80. Se tomaron explantes de aproximadamente 1 cm^2 de la porción media y basal de la lámina foliar, y se colocaron en contacto con el medio primario (Orozco et al 1989), en platos de petri a 25 °C ± 2, en oscuridad.

Diseño experimental. Se sembraron 24 experimentos, en cada experimento se incluyeron de 2 a 4 genotipos. En todos los experimentos se utilizó un diseño completamente al azar, con 15 repeticiones, tomando como unidad experimental una caja de petri con 10 explantes. Las variables evaluadas fueron los tipos de respuesta embriogénica, así: Embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) cuando se producen de 1 a 10 embriones por explante, Embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) en este caso se produce tejido embriogénico que da origen aun alto número de embriones por explante y Embriogénesis somática total (EST), es la sumatoria de la ESBF y la ESBF.

Análisis de la información. Se hizo un análisis de varianza no-ortogonal; como fuente de variación se consideraron: genotipos, meses y su interacción. Cuando hubo diferencias entre los genotipos se hicieron comparaciones entre grupos de genotipos, de acuerdo con su genealogía; considerando que estas diferencias tienen una base genética. Cuando la diferencia fue entre meses se calculó la diferencia mínima significativa (DMS). Finalmente, los genotipos fueron separados según su capacidad embriogénica, así: a) Baja. Los genotipos con limites de confianza inferior (LCI de 0 a 20; b) Media. Los genotipos con LCI entre 21 a 50 y c) Alta. Los genotipos con LCI mayores de 51 %.

RESULTADOS

Efecto del genotipo. El porcentaje embriogénico de los genotipos regenerados estuvo entre 12 a 72.7% (Tabla 2), lo que indica que hay gran variación en los genotipos estudiados. Capacidad embriogénica diferente reportó Aponte (1993) en dos genotipos del mismo origen. Además Michaux-Ferriere et al (1989), compararon la evolución histológica de tres genotipos embriogénicos de *C. arabica* (KF2.1, KF.2.6 y ET25), y de uno recalcitrante (ET20.1), encontrando que las diferencias embriogénicas entre genotipos se deben a la interacción del genotipo y las condiciones fisicoquímicas del cultivo.

Seis genotipos fueron clasificados de capacidad embriogénica alta, con excepción del A.219 todos tuvieron un coeficiente de variación menor a 38.7% y la desviación estándar fue baja. Además, el LCI estuvo entre 50 y 71%, lo que significa que la capacidad de regeneración de embriones y/o Tejido embriogénico es repetible. La figura 1 presenta la respuesta embriogénica del genotipo BK.620 con capacidad embriogénica alta. Los genotipos que fueron clasificados como de capacidad media y baja tuvieron un coeficiente de variación entre 45 y 86% y el LCI fue menor de 42.2%; esto indica que el porcentaje de regeneración no es aceptable. La figura 2 muestra la capacidad embriogénica baja del genotipo BG.60.

Al realizar las comparaciones señaladas en la tabla 3, se observaron diferencias altamente significativas entre las progenies desarrolladas a partir del Ar.1322 y la del Ar.1324, siendo más embriogénicas las descendientes del primero. Entre las tres progenies descendientes del Ar.1322 (PL.1372, PL.1402 y PL.1406), la PL.1402 fue significativamente más embriogénica y su descendiente el A.0192 dio origen a tres progenies (Nr.66, Pr.227 y Sp.092), siendo las descendientes de la Nr.66 significativamente más embriogénicas y no hubo diferencias entre ellas (BK.50, BK.45 y BK.620); según la escala de clasificación estos genotipos son de capacidad embriogénica alta. Estos resultados muestran que las diferencias en la capacidad embriogénica estuvieron relacionadas con la generación, observándose segregación hasta la F3, que disminuyó en las generaciones siguientes y los materiales F4 derivados de un mismo progenitor produjeron respuesta similar, indicativo de que la capacidad embriogénica depende de factores genéticos. Resultados similares reportó Duncan et al (1985), al estudiar varias líneas encontró que las progenies de parentales embriogénicos eran también embriogénicas; esto indica que la proliferación de plantas en maíz esta genéticamente determinada; lo cual tiene utilidad para predecir la capacidad de regeneración de una línea sin probar, por la respuesta de su parental.

Tabla 2. Promedio (X), coeficiente de variación (CV), desviación estándar (DS), Limite de confianza inferior (LCI) y clasificación de la EST.

F3	F4	F5	N	X	DS	CV	LCI	Clasificación
A.0192	Nr.066	BK.45	42	72	18	25	71	Alta
	"	BK.50	48	66	19	29	64	Alta
	"	BK.620	231	60	23	38	60	Alta
	Sp.092	BK.640	55	51	16	31	50	Alta
	"	BK.635	261	42	20	47	42	Media
	Pr.227	BI.698	57	45	26	58	43	Media
A.0219			20	53	26	49	50	Alta
	Nr.671	BI.720	39	26	23	86	24	Media
	Lb.499	BG.60	25	12	8.3	69	11	Baja
A.0404	Rs.460	BK.500	35	32	14	45	31.0	Media
A.0241	Rs.585	BI.302	17	55	9	17	54.2	Alta
A.0240	Rs.094	BG.90	26	36	17	49	34.4	Media
A.0041	Pr.643	BI.390	201	32	19	60	31.4	Media

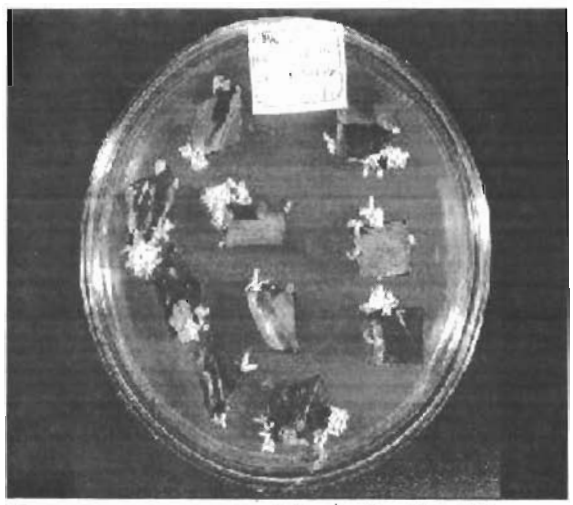


Figura 1. Explantes del genotipo BK.620 con capacidad embriogénica alta.

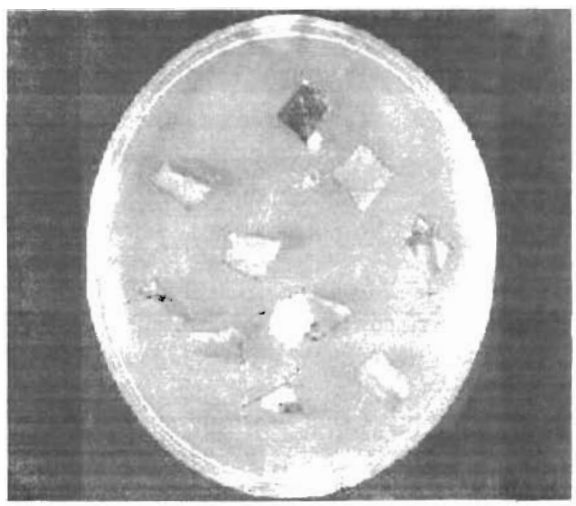


Figura 2. Explantes des genotipo BG.60 com capacidad embriogénica baja.

Tabla 3. Pruebas de contraste entre genotipos.

Genotipos	Promedios	Significancia
Ar.1322 vs Ar.1324	51.5 vs 31.2	**
A.240 vs A.241 (PL.1372).	36.10 vs 55.30	**
A.219 (F3) vs A.219 (F5)	53.70 vs 19.4	**
BK.635 vs BK.640 (Sp.092)	42.8 vs 51.9	Ns

Tabla 4. Promedio, desviación estándar y Limites de confianza (LC) de la EST en varios meses de recolección de los explantes.

Mes siembra	N°Cajas	Promedio	DS	LC	
Julio/93	15	98,3	24,2	67,3	91,8
Mayo/94	48	70,6	26,3	45,9	60,8
Junio/93	16	67,8	31,5	33,7	64,6
Agosto/94	70	62,7	27,5	59,5	72,4
Abril/94	69	59,5	33,2	51,8	67,5
Junio/96	40	56,7	28,2	47,0	64,5
Mayo/96	69	53,6	37,9	38,2	56,1
Marzo/94	36	52,1	27,7	44,4	50,4
Julio/94	25	51,8	26,1	29,1	49,6
Agosto/96	45	51,4	32,8	42,0	61,1
Septiembre/94	38	50,9	28,1	43,4	61,3
Abril/96	74	50,4	28,2	35,5	48,3
Junio/94	36	50,2	23,5	34,2	49,6
Octubre/96	61	50,0	33,7	47,7	64,6
Diciembre/94	40	47,7	31,9	36,3	56,0
Julio/96	55	47,2	26,4	45,7	59,7
Septiembre/96	50	45,2	31,9	38,8	56,5
Febrero/94	37	37,4	30,1	16,2	35,7
Diciembre/96	42	28,8	32,5	35,5	55,2
Enero/96	39	16,7	21,6	13,0	26,5
Marzo/96	30	12,9	20,8	16,9	31,8
Agosto/93	39	10,6	20,6	22,5	35,3
Febrero/96	60	10,0	20,4	12,7	23,0
Noviembre/96	23	2,3	24,1	7,3	27,0

Mes de siembra.

El análisis combinado mostró diferencias entre meses; los mejores fueron julio/93 (98.31%), mayo/94 (70.60%), junio/93 (67.78%) (Tabla 4). Los meses de mayor respuesta embriogénica coinciden con las épocas de crecimiento vegetativo del café, la cual en algunos años ocurre especialmente en el primer semestre del año, mientras que en otros además del primer semestre, en agosto a septiembre, Gómez (1977). El aumento de la respuesta embriogénica en los meses de crecimiento vegetativo del café podría deberse a que las concentraciones de elementos minerales en la hoja son más altos, debido a la mayor actividad fisiológica de la planta en estos meses; mientras que la competencia entre el crecimiento vegetativo y la fructificación produce agotamiento de las reservas de carbohidratos de las ramas causando un menor crecimiento (Cannel 1975).

No se halló relación entre la respuesta embriogénica en los meses evaluados y elementos climáticos como: precipitación, temperatura, humedad relativa y brillo solar, debido a que esta localidad no presenta condiciones climáticas limitantes para el desarrollo de la planta. Gómez (1977), tampoco encontró relación entre los elementos climáticos y el crecimiento del cafeto en Chinchiná, debido a que esta localidad no presenta condiciones climáticas limitantes para el desarrollo de la planta. Sin embargo, las diferencias en la capacidad embriogénica entre meses se puede atribuir a variaciones significativas en los niveles hormonales de auxinas y de otros elementos como azúcar, almidón y fenoles a través del año (Purushotham et al, 1984). Lo cual explica el aumento de la respuesta embriogénica durante la épocas de florescencia de los árboles, reportado por Berthouly y Michaux - Ferriere (1996).

La interacción genotipo por mes de siembra se debió a que los genotipos con capacidad embriogénica alta fueron menos afectados por la época de recolección de los explantes, que aquellos genotipos de capacidad media y baja quienes tuvieron una influencia marcada del mes de recolección del explante.

CONCLUSIONES

Existen diferencias en la capacidad embriogénica entre genotipos *de C. arabica* var Caturra x Híbrido de Timor, encontrándose algunos genotipos con capacidad embriogénica alta, media y baja, lo cual demuestra la variación de las líneas estudiadas por la diversidad de los progenitores.

Las diferencias en la capacidad embriogénica de los genotipos esta relacionada con el origen genético del material, observándose que hasta la generación F3 se produce segregación del material, mientras que los genotipos derivados de un misma progenie F4 producen una respuesta similar, indicando que la F4 da lugar a una segregación muy baja en su descendencia y la F5 se comporta similar a la F4.

Hay diferencias en la respuesta embriogénica dependiendo de la época del año en que se tomen los explantes y la interacción genotipo por mes de siembra se debe a que los genotipos con capacidad embriogénica alta fueron menos afectados por la época de recolección de los explantes, con respecto de los genotipos con capacidad media y baja.

No se encontró relación entre la respuesta embriogénica en los meses evaluados y elementos climáticos ya que esta localidad no presenta condiciones climáticas limitantes para el desarrollo de la planta.

BIBLIOGRAFIA

Aponte de L, M.E. 1993. Somatic embryogenesis induced by cultured on single media in coffee plants from crosses of Coffea arabica x Híbrido de Timor. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 15. Montpellier (Francia), Juin 6-11. Paris (Francia), ASIC, pp 82-88.

Berthouly, M., N.M. Michaux-Ferriere. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant cell tissue and organ culture. 44: 169-176.

Bieysse, D., A. Gofflot, N.M. Michaux-Ferriere. 1993. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Canadian Journal Botanic. 71: 1496-1502.

Boxtel, J.V., M. Berthouly. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Holland) 44:7-17.

Cannell,M.G.R. 1975. Crop physiological aspects of coffee bean yield: A review. Journal of Coffee Research (India) 5 (1-2): 7-20.

Close, K.R, and L.A. Ludeman. 1987. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. Plant Science 52: 81-89.

Chen, T.H.N., J. Marowitch, and B.G. Thompson. 1987. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Holland) 8: 73-81.

Duncan, D.R., M.E. Williams, B.E. Zehr, J.M. Widholm. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous Zea mays (L.) genotypes. Planta. 165: 322-332.

Gmitter, F.G., G.A. Moore. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of Citrus: Embryo production, germination, and plant survival. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Holland) 6: 139-147.

Gómez, G.L. 1977.Influencia de los factores climáticos sobre la periodicidad de crecimiento del cafeto. Cenicafé (Colombia) 28 (1):3-17.

Hanzel, J.J., J.P. Miller, M.A. Brinkman, E. Fendos. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Science. 25.27-31.

Kahia, J.W., J.B.O. Owuor. 1990. In vitro propagation of the disease resistant *Coffea arabica* L cultivar-Riuru 11. Kenya Coffee (Kenya) 55(646): 901-905.

Ma, H., M. Gu, G.H. Liang, 1987. Plant regeneration from culture immature embryos of Sorghum bicolor (L.) Moench. Theor. Appl. Genet. 73: 389-394.

Maës, O.C., R.N. Chibbar, K. Caswell, N. Leung, K.K. Kartha. 1996. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. Plant science 121: 75-84.

Michaux-Ferriere, N, P. Dublin. 1987. Embryogenese somatique chez Coffea arabica induction et developpement dex cellules embryogénes. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 12. Montreaux (Suiza), Juin 29-Juillet 3, 1987. Paris (Francia), Association Scientifique International du Café-Asic, pp 418-425.

Michaux-Ferriere, N., D. Byesse, D. Alvard, P. Dublin. 1989. Etude histologique de l'embryogenese somatique chez Coffea arábica induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. Café Cacao Thé (Francia) 33 (4): 207-217.

Mroginski, L.A., W.M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. In ROCA, W:M.; MROGINSKI, L.A. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia), Centro. Internacional de Agricultura Tropical, pp. 19-41.

Orozco, F.J., L.C. Londoño, M.T. González, M.L. Marulanda, B.E. Velez. 1989. Aplicaciones del cultivo de tejidos en el mejoramiento del cafeto. In: COLLOQUE Scientifique International sur le café, 13. Paipa (Colombia) 21-25 de Agosto 1989. Paris (Francia), Association Scientifique International du Café - ASIC, pp 749-758.

Purushotham, K., U.V. Sulladmath, P.K. Ramalah. 1984. Seasonal changes in biochemical constituents and their relation to rooting of (Coffea canephora Pierre) sucker cuttings. Journal of Coffee Research (India) 14(3): 117-130.

Rines, H.W., T.J. Mccoy. 1981. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. Crop Science. 21: 837-842.

Rodriguez, R.H. 1985. Obtención de embriones somáticos in vitro de las variedades comerciales de café: Variedad Caturra y Variedad Colombia. Bogotá (Colombia), Universidad Javeriana, 91p. (Tesis Biólogo).

Staritsky, G. 1970. Embroid formation in callus tissues of Coffea. Acta Botanica Neerlandica (Holland). 19 (4) 509-514.

Yavad, R.C., M.T. Saleh, R. Grumet. 1996. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Holland) 45: 207-214.

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DO BOTÃO FLORAL PARA A CULTURA DE ANTERAS NO CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)

Luciana Marques da Cunha Andrade[1],André Barretto Pereira[2], Edilene Carvalho Santos[3], Moacir Pasqual[4]

[1]Bióloga; [2]Pesquisador CEPEC/CEPLAC, Pós-graduação/UFLA; [3]Graduanda Agronomia; [4]Prof. Titular DAG/UFLA, Caixa Postal 37, CEP 372000-000, Lavras-MG.

INTRODUÇÃO

Por ser uma cultura perene, os programas de melhoramento do cafeeiro demandam muito tempo. A cultura de anteras é considerada uma ferramenta importante no melhoramento, pois possibilita a obtenção rápida de linhas homozigotas. Segundo Moraes Fernandes (1990), a obtenção de plantas haplóides seguida pela duplicação dos cromossomos através da utilização de colchicina resulta em linhas homozigóticas em curto espaço de tempo, se comparada com os métodos convencionais. Além da redução de tempo, esta técnica pode ser utilizada em estudos genéticos, pela obtenção de recessivos e indução de mutações. A cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas em gerações segregantes acelera o processo de geração de novos cultivares em vários anos, além de facilitar a análise genética, eliminando a complexidade do estado heterozigoto. As plantas haplóides, possuidoras da metade do número de cromossomos característico da espécie, ficam livres dos problemas de dominância e recessividade por possuirem apenas um alelo em cada loco gênico, permitindo a rápida produção de plantas homozigotas através da duplicação dos cromossomos numa única etapa, substituindo as muitas gerações de autofecundação necessárias no processo usual de obtenção de linhagens.

Para a prática de cultura de anteras, é necessário que se determine o estádio ideal de desenvolvimento das mesmas, sendo que o estádio utilizado deve conter micrósporos que respondam melhor aos processos androgenéticos. Inúmeros trabalhos indicam que a melhor fase é aquela em que o micrósporo está recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, o estádio binucleado. Nesta fase, o micrósporo ainda possui características esporofíticas que permitem a diferenciação do grão de pólen em embrióides "in vitro" (Moraes Fernandes, 1990; Sibi et al., 1979; Luz, 1995; Raghuramulu, 1989).

As células "in vitro" são capazes de originar embriões através da embriogênese, quando submetidas à condições adequadas, antes da primeira mitose. Após esse período ocorre a inativação dos RNAs ribossômicos e de transferência e o desenvolvimento segue o caminho normal para a formação do grão de pólen (Mascarenhas, 1971; Vasil et al, 1979). O objetivo deste trabalho foi o de relacionar os estádios de desenvolvimento dos micrósporos com as caracterísiticas morfológicas do botão floral, determinando o tamanho do botão floral ideal para obtenção de di-haplóides através da cultura de anteras de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizados 4 cultivares de *Coffea arabica* L.: Mundo Novo LCP-37919 ; Catuaí LCH-2077-2-5- 44; Rubi MG-1192 e Icatú LC-3282., pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras.

Aproximadamente 200 botões florais foram coletados no período de 8 à 9 horas da manhã, em seguida foram fixados em álcool etílico e ácido acético na proporção de 3:1 durante 24 horas, sendo posteriormente armazenados em álcool 70% e mantidos a uma temperatura de 4°C.

Os botões florais foram separados de acordo com o seu comprimento, em cinco classes distintas, de acordo com os valores mínimos, máximos e médias, a saber: classe 1 (1,5; 1,72; 2,0 mm); classe 2 (2,5; 2,98; 3,5 mm); classe 3 (4,0; 4,48; 5,0 mm); classe 4 (4,5; 5,30; 6,0 mm); classe 5 (6,5; 7,20; 8,0 mm), as quais foram correlacionadas com o comprimento do botão floral, comprimento da antera e as fases de desenvolvimento do micrósporo.

Foi utilizado um paquímetro para a medição do comprimento dos botões florais, bem como do comprimento de suas anteras. Foram analisados 3 botões de cada classe para todos os genótipos.

O estádio de desenvolvimento dos micrósporos foi avaliado pela confecção de duas lâminas por botão, sendo duas anteras por lâmina, cujos micrósporos foram corados com carmin propiônico 1%. Determinou-se a contagem de micrósporos nas fases de tétrade, recém liberado de tétrade, núcleo central, núcleo deslocado e

espessa camada de exina, a partir de amostras de 200 micrósporos por lâmina por cultivar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução da antera, em relação ao comprimento do botão floral, evidenciou a existência de um sincronismo no desenvolvimento e que este está relacionado com os estádios de desenvolvimento do micrósporo. Na Tabela 1, estão apresentadas as contagens de micrósporos nas diferentes fases de seu desenvolvimento, conforme as classes de comprimento do botão floral. O teste de contingência (χ^2) foi altamente significativo, evidenciando que o estádio de desenvolvimento do micrósporo está correlacionado com as classes de botões florais.

Os botões florais contêm anteras que apresentam micrósporos em diferentes estádios de desenvolvimento, porém para cada classe, apenas um estádio ocorre em maior percentagem (Tabela 1).

Os botões florais da classe 1 apresentaram comprimento de 1,50 a 2,00 mm contendo anteras de 1,00 a 2,00 mm de comprimento. Nestas, a maioria dos micrósporos, cerca de 88%, encontravam-se envolvidos pela calose, formando a tétrade meiótica, e o restante, recém liberado da tétrade, para todas as cultivares (Tabela 1). A classe 2 corresponde aos botões que variam de 2,50 a 3,50 mm de comprimento e anteras de 2,00 a 3,50 mm, sendo que estas apresentaram micrósporos predominantemente recém liberados da tétrade, com cerca de 65% dos micrósporos nesta fase, e os demais distribuídos nos outros estádios de desenvolvimento (Tabela 1). A classe 3, na qual os botões florais mediam de 4,00 a 5,00 mm de comprimento e anteras variando de 3,50 a 4,00 mm de comprimento, as 4 cultivares apresentaram cerca de 66% dos micrósporos vacuolados e com núcleo não central. Observou-se também a presença de micrósporos nos estádios recém liberado da tétrade, até o estádio onde o micrósporo já apresentava camada de exina formada, porém, em pequena percentagem (Tabela 1). Os botões, na classe 4, variaram de 4,50 a 6,00 mm de comprimento e apresentando anteras de 4,50 a 5,50 mm de comprimento, apresentaram cerca de 70% dos micrósporos em estádio uninucleado central (Tabela 1). Esta é a classe, cujos botões deverão ser utilizados para a cultura de anteras. Estes dados apresentam divergências em relação àqueles observados por Ascanio e Arcia (1994), para anteras de *Coffea arabica* var. Garnica, onde verificaram a presença da fase uninucleada central em botões com tamanho de 3,00 a 4,00 mm de comprimento. Na classe 5, os botões variaram entre 6,50 a 8,00 mm de comprimento e suas anteras de 6,50 a 8,00 mm de comprimento. Nesta fase os micrósporos já se encontravam maduros, com a exina completamente formada (Tabela 1).

Este resultado também foi verificado por Ascanio e Arcia (1994), e corresponde a uma fase inadequada para a cultura de anteras, pois já se inicia a formação do grão de pólen. Nesta fase, o processo de desenvolvimento não pode ser mais revertido, pois ocorre uma inativação dos RNAs ribossômicos e de transferência do grão de pólen. O micrósporo já apresenta uma grossa camada de exina que corresponde a um estádio mais avançado da microsporogênese, onde ocorre um engrossamento da parede celular, prejudicando o processo de regeneração (Mascarenhas, 1971; Vasil et al, 1979; Ascanio e Arcia, 1994).

TABELA 1 - Estádio de desenvolvimento dos micrósporos, de acordo com as diferentes classes de tamanho em relação ao comprimento (mm) e média dos botões florais (mm) e comprimento (mm) das anteras, UFLA, Lavras, MG, 1998

	Botão Floral	Antera	Estágios dos Micrósporos					
Classe	Comprimento	Comprimento	Tétrade	Recém liberado de tétrade	Núcleo deslocado	*Núcleo central	Com exina formada	TOTAL OBS.
1	1.50; 1.72; 2.00	1.0 - 2.0	176	24	0	0	0	200
2	2.50; 2.98; 3.50	2.0 - 3.5	26	130	20	20	4	200
3	4.00; 4.48; 5.00	3.5 - 4.0	0	10	132	52	6	200
4	4.50; 5.30; 6.00	4.5 - 5.5	0	10	50	140	0	200
5	6.50; 7.20; 8.00	6.0 - 8.0	0	0	0	20	180	200

* - Estádio ideal para utilização na cultura de anteras $\chi^2_C = 2.146,29$ ($P < 0,01$)

CONCLUSÃO

Nas 4 cultivares de *C.arabica* avaliadas, verificou-se que a maior percentagem de micrósporos apresentando um núcleo central, ideal para a obtenção de plantas haplóides "in vitro", encontra-se em anteras que variam de 4,5 a 5,5 mm de comprimento, presentes em botões florais que variam de 4,5 a 6,0 mm de comprimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASCANIO, E.C.E; ARCIA, M.A.M. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arábica L. Var. Garnica*. **Café Cacao Thé,** v:28, n.2 p.75-79. 1994.

LUZ, J.M.Q. Embriogênese somática "in vitro" em anteras de Pimentão (Capsicum annum L.)

MASCARENHAS, J.P. RNA and protein synthesis during pollen development and tube growth. In: Heslop-HARRISSON, J., ed. **Pollen devellopment and physiology**. London, Butterworth, p.201-222, 1971

INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA CULTURA DE EMBRIÕES "IN VITRO" DO CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO LCH 2077-2-5-44.

Luciana Marques da Cunha Andrade[1], André Barretto Pereira[2], [3]Ronilda Juliana de Campos, [4]Moacir Pasqual

[1]Bióloga;– [2]Pesquisador CEPEC/CEPLAC, Pós-graduação/UFLA;– [3]Graduanda Agronomia;– [4]Prof. Titular DAG/UFLA, Caixa Postal 37, CEP 372000-000, Lavras-MG.

INTRODUÇÃO

A cultura de embriões "in vitro" é uma técnica importante pois, tanto possibilita o estudo mais detalhado dos problemas nutricionais e fisiológicos do embrião, como também promovem o desenvolvimento de híbridos interespecíficos que normalmente não sobrevivem; permite realizar a clonagem de plantas selecionadas com o objetivo de antecipar a época de plantio, e também obter plantas a partir de embriões imaturos, ou seja, em estágio precoce do fruto.

O embrião originado de um processo normal de fecundação pode ser facilmente separado e cultivado em condições assépticas em meio de cultura adequado. Este mantem-se geneticamente estável, produzindo descendentes idênticos a ele. Para a remoção do embrião, basta desinfetar apenas a superfície externa da semente, devido ao fato de que o embrião esta alojado em região estéril da semente. Assim o índice de contaminação "in vitro"é muito baixo em relação às demais culturas (Illg, 1985).

O meio de cultura adequado, tanto para propagação, quanto para a cultura de embriões deve ser adaptado para cada espécie. Os primeiros estudos envolvendo meio de cultura para embriões usaram amplamente a solução de Snop (Andreoli, 1985). Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais freqüentemente utilizado é o "MS" (Murashige e Skoog, 1962), embora outros meios tenham mostrado grande eficiência.

O cafeeiro, como outras culturas, libera substâncias fenólicas no meio de cultura e por esta razão deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como: carvão ativado, Polivinilpirrolidone (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico.

O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores concentrações dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina), utilizados na cultura de embriões "in vitro" da cultivar Catuaí vermelho LCH 2077-2-5-44.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras - Minas Gerais.

O meio nutritivo básico utilizado foi o "MS" (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 6mg/l de GA_3 sendo que o pH foi ajustado para 5,9. Para a solidificação do meio foi utilizado ágar na proporção de 7g/l.

Após o preparo, foram distribuídos cerca de 10 ml de meio por tubo de ensaio (2,5 x 15 cm), os quais foram vedados com tampa de polipropileno. O meio foi esterilizado utilizando-se autoclavagem à temperatura de 121 °C , durante 20 minutos e 1 atm de pressão.

O processo de inoculação foi realizado assepticamente em câmaras de fluxo laminar horizontal. Após o processo de inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura igual a 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2500 lux, suprida por lâmpadas Grow-lux e Branca-fria, na proporção de 1:1, permanecendo nestas condições por um período de 60 dias. Em todos os experimentos foram realizadas avaliações visuais nos primeiros 30 dias após a instalação, e foram avaliadas as variáveis número total de brotos, número total de folhas, comprimento dos brotos (cm), peso da matéria fresca e peso da matéria seca (mg).

O material vegetal utilizado foi *Coffea arábica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, sendo utilizados frutos no estádio de cereja para a extração de sementes. Após a retirada do pergaminho, as sementes permaneceram em água destilada por 15 horas. Após este período elas foram mergulhadas em hipoclorito de sódio por 1 minuto, e posteriormente em álcool 70% por meia hora. Os embriões foram extraídos sobre placas de petri, sob estereomicroscópio, mantendo-os intactos. Em seguida foram inoculados no meio, colocando-se um embrião por tubo de ensaio, correspondendo à parcela experimental.

Os tratamentos foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l) e de BAP (0,0;

3,0; 6,0 e 9,0 mg/l), resultando num fatorial 4 x 4, utilizando-se delineamento inteiramente casualisado (DIC) com 4 repetições.

Para a análise estatística, foram utilizadas duas maneiras de decompor a variação entre tratamentos. A primeira delas correspondeu ao desdobramento em fatores principais e interação entre eles, típico de ensaios fatoriais. A outra maneira fez uso do ajustamento a modelos de superfície de resposta (Box e Draper, 1987), quando as diferenças entre os tratamentos mostraram-se significativas pelo teste F. O método de 'backward' (Draper e Smith, 1981) foi utilizado para a seleção de modelos de regressão múltipla envolvendo os fatores testados no experimento, utilizando-se o resíduo da análise de variância para testar a significância dos coeficientes de regressão. Uma vez determinado o modelo, testava-se a significância dos desvios de regressão para verificar a adequabilidade do modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância, para as características avaliadas, estão representadas nas Tabela 1, considerando a partição da variação entre tratamentos segundo o esquema fatorial, e nas variações devido ao modelo de regressão múltipla ajustado e devido aos desvios de regressão. Observa-se que para as características número total de brotos, número total de folhas, brotos maiores que 1 centímetro, peso fresco e peso seco, houve uma interação significativa entre os reguladores de crescimento utilizados. O desvio de regressão, para todas as variáveis, não foi significativo, evidenciando que os modelos foram ajustados satisfatoriamente.

Número de brotações

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, a utilização da concentração máxima de auxina (ANA=1,00 mg/l), associada à concentração de citocinina BAP de 7,42 mg/l, promoveu o maior número de brotações (valores estimados dentro do intervalo avaliado). O número de brotações esperado para esta combinação seria de 3,00 brotações/explante (Figura 1). Não houve interação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP, através da análise fatorial (Tabela 1), porém, o mesmo não foi observado pelo modelo de regressão múltipla ajustado (Figura 1), pois neste, ocorre a presença de termos envolvendo os dois fatores, o que demostra a presença de interação. Os desvios de regressão para esta variável, mostraram-se não significativos, evidenciando que os modelos ajustados utilizados foram satisfatórios (Tabela 1). Concentrações elevadas de auxina, associadas à concentrações elevadas de citocinina, promoveram um aumento no número de brotações. O contrário foi observado por George (1994), em cujo trabalho, concentrações elevadas de auxina, inibiam o desenvolvimento do embrião. Raghuramulu (1989), também obteve grande êxito em *C. arabica*, quando utilizou concentrações de 1,00 mg/l de ambos reguladores de crescimento. Concentrações acima ou abaixo destas não foram satisfatórias. As concentrações acima de 1,00 mg/l de auxina foram consideradas tóxicas, promovendo morte do embrião.

Número de brotos maiores que um centímetro

O modelo de superfície de resposta ajustado demostrou que o número máximo de brotações maiores que 1,00 cm foram obtidas com concentrações hormonais em sua dosagem máxima (ANA = 1,00 mg/l e BAP = 9,00 mg/l) como pode ser observado na Figura 3, em um período de 60 dias de cultivo. Para esta característica houve interação entre os fatores (Tabela 1), o que pôde ser confirmado pela presença de termos no modelo envolvendo os dois fatores, simultaneamente (Figura 2). Inúmeros trabalhos mostram que o sucesso na cultura de embriões está associado a diversos fatores, incluindo o comprimento do explante, que deve ser igual ou superior a 1,00 cm, permitindo uma maior sobrevivência (Colona, 1972; Krasnyanski et al, 1992; Raghuramulu, 1989).

Número total de folhas

Para o número total de folhas, ocorreu interação entre os fatores demonstrado, tanto pela análise fatorial (Tabela 1), quanto pelo modelo ajustado, sendo confirmado pela existência de termos no modelo envolvendo os dois fatores simultaneamente. A não significância dos desvios de regressão demonstra que o modelo utilizado foi satisfatório (Tabela 1). A concentração máxima de auxina (ANA = 1,00 mg/l), juntamente com 7,39 mg/l de citocinina (BAP) resultou num maior número de folhas por explante. Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado para estas concentrações, espera-se que o número total de folhas seja de 12 folhas por explante.

Peso de matéria fresca e seca da parte aérea das brotações

Nestas características as concentrações intermediárias de ambos os reguladores de crescimento promovem uma resposta maior. Segundo o modelo de superfície de resposta ajustado, a resposta máxima seria obtida com uma

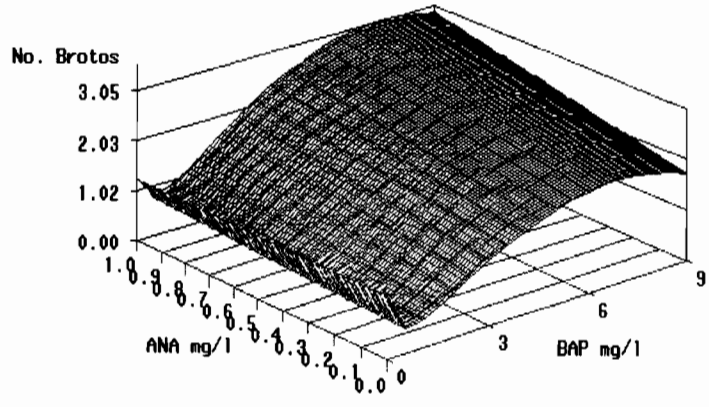
concentração de ANA igual a 0,53 mg/l e BAP igual a 6,00 mg/l, obtendo em média, um peso da matéria fresca de 148,53 mg/explante.

Na análise do ensaio fatorial (Tabela 1), para a característica peso da matéria seca, não houve interação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP, porém no modelo de regressão múltipla ajustado observa-se a presença de termos envolvendo apenas um dos fatores, o regulador de crescimento BAP, demonstrando que as dosagens crescentes deste fator influenciaram na resposta para o aumento do peso seco.

TABELA 1 Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), número de Brotos maior que 1 cm (NB>1), número total de folhas (NTF), peso fresco (PF)e peso seco da parte aérea das brotações (PS) em função das concentrações de ANA e BAP, em um período de 60 dias de cultivo "in vitro", UFLA, Lavras, MG. 1998.

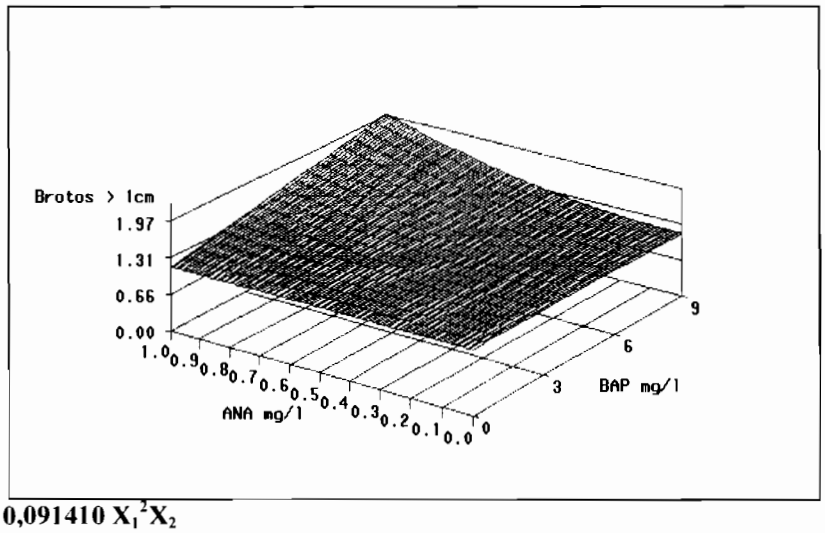
	NTB[1/]		NB>1[1/]		NTF[1/]		PF[1/]		PS[1/]	
Causa da variação	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tratamentos	(15)	1,3098**	(15)	0,3091**	(15)	75.6338**	(15)	3027,7500**	(15)	80,9784
ANA	3	1,8018**	3	0.6563**	3	10,8965**	3	3158,3439**	3	96,3355
BAP	3	3,8671**	3	0,2998*	3	8,9978**	3	7126,3501**	3	170,8920*
ANA x BAP	9	0,2933	9	0,1965*	9	1.7723**	9	1618,0186*	9	45,8882
Regressão	4	4,7187**	1	3,5211**	4	17,5756**	4	7607,1770**	5	209,0624**
Desvio	11	0,0701	14	0,0797	11	0,4847	11	1362,5038	10	16,9364
Resíduo	48	0,1748	48	0,0891	48	0,6240	48	741,2335	48	50,7636
C.V.(%)		23,94		23,85		30,42		47,43		71,60

[1/] Observações transformadas segundo $\sqrt{(X + 0,5)}$; * e ** Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.



$$1,224745 + 1,378642\ X_2 - 0,072996\ X_2^2 - 1,989705\sqrt{X_2} + 0,379332\ X_1\sqrt{X_2}$$

FIGURA 1 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998



$Y = 1,147714 + 0,091410\ X_1^2X_2$

FIGURA 2 – Superfície de resposta para a característica comprimento das brotações (brotos maior que 1 cm) em resposta as dosagens de ANA e BAP. UFLA. Lavras, MG, 1998

CONCLUSÕES

Para todas as características avaliadas, a concentração máxima de ANA(1,00mg/l) foi a que proporcionou os melhores resultados, com exceção ao peso fresco, cuja concentração de ANA foi estimada
como sendo 0,53 mg/l, e ao peso seco, que não foi afetado pelo ANA. Para o número de brotações e folhas, as concentrações ideais de BAP foram semelhantes, em torno de 7,40 mg/l. A concentração de BAP igual a 9,00 mg/l maximizou o número de brotos maiores que 1cm, mas altas respostas também foram observadas com dosagens acima de 6,00 mg/l. Neste caso, pode-se utilizar uma determinada combinação adequada para todas as características, sendo esta de BAP 7,40 mg/l e ANA 1,00 mg/l.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: **SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**, 1, Brasília, 1985. Anais... Brasília:ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p. 25-28.

BOX,G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley e Sons, 1987. 669p.

COLONNA, J.P. Contribution a letude de la culture "in vitro" d'embryos de cafeiers. Action de la cafeine. **Café, Cacao, Thé**, v.**16**, p. 193 – 203, 1972.

DRAPER, N.R.; SMITH,H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley e Sons, 1981. 709p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. I The Technology 2ed. Edington: Exegetics, 574p., 1993.

ILLG,R.D. Metodologia de seleção in vitro para resistência a fatores causadores de estresse. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**, I. EMBRAPA - Brasília,1985. p.45-47.

KRASNYANSKI, S.; POLGÁR, Z.; NÉMETH, G.; MENEZEL, L. Plant regeneration for callus and protoplast of *Heliantus giganteus* L. **Plant Cell Reports**, v.**11**, p.7-10. 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. v.**15**, p.473-479. 1962.

RAGHURAMULU, Y. Anther and endosperm culture of Coffee. **Journal of Research**. v:**19**, n.2 p.71-81, 1989.

INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO "IN VITRO" DA CULTIVAR CATUAÍ VERMELHO LCH 20 77-2-5-44

Luciana Marques da Cunha Andrade[1], André Barretto Pereira[2], Anna Lygia de Rezende Maciel[3], Moacir Pasqual [4]

[1]Bióloga;– [2]Pesquisador CEPEC/CEPLAC, Pós-graduação/UFLA;– [3]Bolsista CBP&D/CAFÉ;– [4]Prof. Titular DAG/UFLA, Caixa Postal 37, CEP 372000-000, Lavras-MG.

INTRODUÇÃO

A técnica de cultura de tecidos vegetais "in vitro" possibilita a propagação em larga escala e em curto espaço de tempo, sendo importante para as culturas de ciclo longo. Esta técnica é vantajosa quando aplicada em variedades melhoradas que possuam pouco material e necessitam ser propagadas rápida e massivamente, com a finalidade de produção de mudas.

A ocorrência natural de determinados hormônios é insuficiente para suprir as necessidades da planta, portanto é necessário a adição suplementar dessas substâncias para se obter resultados satisfatórios e promissores em relação à micropropagação (Pasqual e Pinto, 1988).

Curster (1980) foi um dos primeiros a trabalhar com micropropagação em *Coffea arabica*, obtendo sucesso com a propagação de brotos ortotrópicos e plagiotrópicos em meio de cultura "MS", concentrações elevadas de auxinas e baixas concentrações de citocininas, tendo resultados semelhantes aos obtidos pelos métodos convencionais "in vivo", sendo que a maior dificuldade correspondeu à contaminação e a oxidação dos explantes utilizados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das concentrações dos reguladores de crescimento BAP, GA_3 e TDZ na micropropagação da cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras – Minas Gerais.

O material vegetal utilizado foi *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44, sendo que as plântulas já se encontravam estabelecidas "in vitro", com cerca de seis meses de vida.

O meio nutritivo básico utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), sendo que o pH foi ajustado para 5,9. Para a solidificação do meio foi utilizado ágar (7g/l).

Foram conduzidos dois experimentos, nos quais foram avaliadas aos 90 dias as variáveis número total de brotos, número de folhas, número de brotos maiores que 1cm, peso de matéria fresca e seca (mg).

Os explantes utilizados foram retirados de plântulas isentas de contaminantes, desprezando-se as folhas e a gema apical, utilizando-se sempre uma microestaca por tubo com 2 gemas e estas foram inoculadas verticalmente no meio.

Experimento 1: Multiplicação "in vitro" variando-se as influência das concentrações de BAP e GA_3 no cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44.

Neste experimento os tratamentos utilizados foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de BAP: 0,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg/l e de GA_3: 0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/l, resultando em um fatorial 4 x 5, disposto em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições.

Experimento 2: Multiplicação "in vitro" variando-se as concentrações de TDZ e GA_3 no cultivar Catuaí Vermelho LCH 2077-2-5-44.

Neste experimento os tratamentos foram constituídos de todas as combinações possíveis entre as concentrações de TDZ: 0,0; 3,0; 6,0 e 9,0 mg/l e de GA_3 : 0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/l, resultando em um fatorial 4 x 5, disposto em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições.

Análises estatísticas

Para a análise estatística, foram utilizadas duas maneiras de compor a variação entre tratamentos. A primeira delas correspondeu ao desdobramento em fatores principais e interação entre eles, típico de ensaios fatoriais. A outra maneira fez uso do ajustamento a modelos de superfície de resposta (Box e Draper, 1987) quando as diferenças entre os tratamentos mostraram-se significativas pelo teste F.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

O resumo das análises de variância, para as características avaliadas, está apresentado nas Tabela 1. Observa-se que nas três primeiras características, número total de brotos, número de

brotos maiores que 1cm e número total de folhas, houve interação significativa entre os reguladores de crescimento BAP e GA_3.

Número de brotações

O modelo de superfície de resposta ajustado (Figura 1) demonstra que para a maximização no número de brotações, a dosagem adequada de citocinina (BAP) deve ser igual a 0,99 mg/l em ausência de ácido giberélico (GA_3) dentro do intervalo avaliado. O número de brotações esperado para esta combinação é de 2,42 brotações/explante. Nota-se também que, sob concentrações crescentes de GA_3, associadas a uma dosagem constante de BAP igual a 0,99 mg/l, ocorre uma redução no número de brotações. Este fato evidencia que o ácido giberélico, para esta característica não mostrou-se eficiente.

Número de brotos maiores que 1 cm

O maior número de brotações maiores que 1,00 cm foi verificado, utilizando concentração máxima de ácido giberélico (GA_3 =20,00 mg/l) associado à concentração máxima de citocinina (BAP = 9,00 mg/l), de acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado.

Número total de folhas

O aumento no número de folhas/explante foi obtido quando a concentração da citocinina BAP era de 0,95mg/l na ausência do regulador de crescimento GA_3. O número total de folhas estimado seria de 12 folhas/explante. As concentrações utilizadas de GA_3 associadas às concentrações de BAP apresentaram redução no número de folhas e clorose generalizada.

Peso da matéria fresca e seca da parte aérea das brotações

Houve um aumento no peso fresco das brotações quando o hormônio GA_3 estava ausente e o BAP na concentração de 0,96 mg/l, podendo neste caso atingir o peso fresco médio de 105,79 mg/l. A variável peso seco apresentou resposta semelhante ao peso fresco, sendo que os melhores resultados foram obtidos na ausência de GA_3 e BAP na dosagem de 1,0 mg/l.

Experimento 2

Os resultados obtidos para as características avaliadas no experimento 2 estão apresentados na (Tabela 2. Todas as características, exceto peso seco, foram influenciadas pela interação entre os reguladores de crescimento TDZ e GA_3 (Tabela 2).

Número de brotações

O maior número de brotações estimado, segundo o modelo de superfície de resposta ajustado, é obtido quando a concentração de GA_3 atinge o sua dosagem máxima (GA_3 = 20 mg/l) interagindo com a dosagem de 0,94 mg/l de TDZ, sendo o número de brotações estimado de 2,15 brotações/explante (Figura 2). A interação entre os reguladores de crescimento foi verificada pela análise de variância (Tabela 2). O desvio de regressão para esta característica não foi significativo, o que indica que o modelo ajustado foi satisfatório (Tabela 2).

Neste experimento houve uma maior influência do hormônio GA_3 aumentando o número de brotações, ao contrário do ocorrido no experimento 1, no qual, a ausência deste hormônio provocou os melhores resultados. A citocinina, BAP e o TDZ, em ambos os experimentos, determinaram uma melhor resposta sob semelhantes concentrações, sendo de 0,99 mg/l para o experimento 1 e 0,94 mg/l para o experimento 2, correspondendo a resultados semelhantes.

Número de brotos maiores que 1 cm

Para obtenção de maior número de brotações com tamanho superior a 1,00 cm, a combinação das dosagens hormonais seria de 0,98 mg/l de TDZ associado a 20,00 mg/l de GA_3. As concentrações crescentes de TDZ em relação à ausência de GA_3 apresentaram comportamento constante, e as dosagens intermediárias entre 0 e 3,00 mg/l de TDZ associadas às crescentes dosagens de GA_3 apresentaram respostas satisfatórias.

Número Total de folhas

A maximização no número total de folhas/explante, foi obtida na utilização do hormônio GA_3 na sua dosagem máxima (GA_3 = 20mg/l), interagindo com TDZ na dosagem de 0,98 mg/l. Neste caso o número total de folhas seria de 5 folhas/explante.

Peso fresco e peso seco da parte aérea das brotações

O aumento no peso fresco das brotações, foi obtido com concentração de TDZ igual a 0,84 mg/l associado à dosagem máxima de GA_3 20 mg/l, correspondendo a um peso fresco estimado de 80,71 mg.

O peso seco da parte aérea das brotações não apresentou diferenças significativas entre as concentrações dos reguladores de crescimento. (Tabela1)

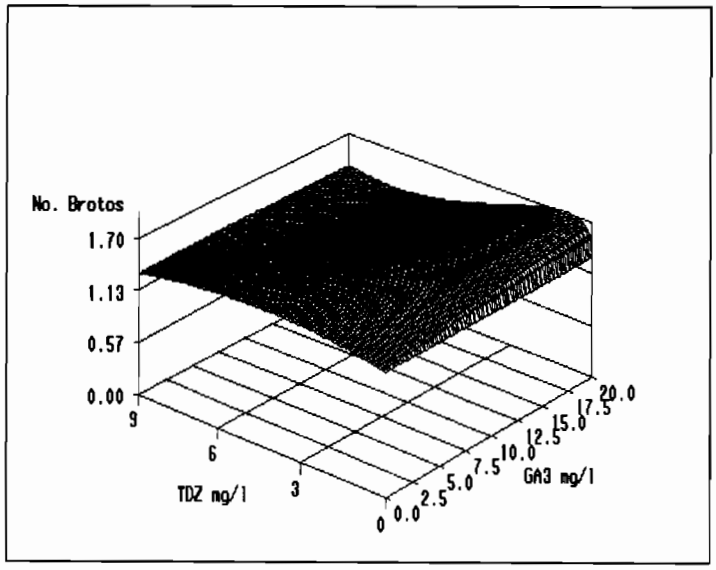
TABELA 1 Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm (NB>1), o número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) da parte aérea das brotações e peso seco (PS) em função das concentrações de BAP e GA3, em um período de 90 dias de cultivo "in vitro", UFLA, Lavras, MG. 1998.

	NTB[1/]		NB>1[1/]		NTF[1/]		PF[1/]		PS[1/]	
C. V.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tratamentos	(19)	0,4546**	(19)	0,1035**	(19)	7,1285**	(19)	2050,9436**	(19)	20,6766**
BAP	3	1,1601**	3	0,1620**	3	17,6153**	3	5433,7389**	3	73,2475**
GA_3	4	0,7969**	4	0,0969	4	11,9004**	4	3357,0180**	4	17,0217**
BAP x GA_3	12	0,1641*	12	0,0911*	12	2,9162*	12	769,8866	12	8,7523
Regressão	7	1,0853**	8	0,1535**	8	14,4832**	7	5311,7747**	7	51,7043**
Desvio	12	0,0867	11	0,0672	11	1,7796	12	148,7921	12	2,5960
Resíduo	60	0,0725	60	0,0404	60	1,5170	60	407,0558	60	4,6009
C.V.(%)		16,74		16,69		41,50		46,61		37,38

TABELA 2 Resumo das análises de variância para número total de brotos (NTB), o número de Brotos maior que 1 cm (NB>1), o número total de folhas (NTF), peso fresco (PF) e peso seco (PS) da parte aérea das brotações em função das concentrações de TDZ e GA_3, em um período de 60 dias de cultivo "in vitro", UFLA, Lavras, MG. 1998.

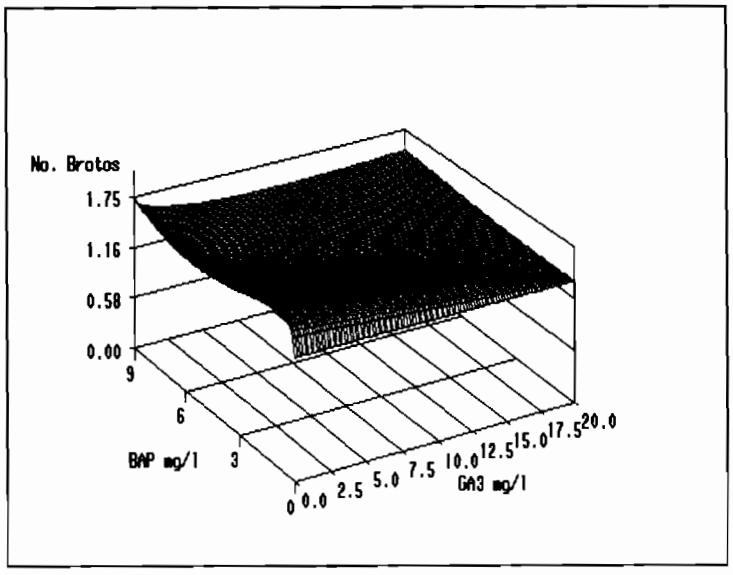
	NTB[1/]		NB>1[1/]		NTF[1/]		PF		PS	
C. V.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tratamentos	(19)	0,2299**	(19)	0,1216**	(19)	1,8523**	(19)	849,2742**	(19)	22,1848
TDZ	3	0,9435**	3	0,2312**	3	7,0486**	3	1560,2744**	3	13,1864
GA_3	4	0,0112	4	0,0432	4	0,2700	4	608,6828*	4	28,6297
TDZ x GA_3	12	0,1243**	12	0,1203**	12	1,0807**	12	751,7214**	12	22,2860
Regressão	5	0,7230**	3	0,4440**	6	4,9759**	9	1198,2081**	-	-
Desvio	14	0,0537	16	0,0611*	13	0,4107	10	535,2338**	-	-
Resíduo	60	0,0516	60	0,0316	60	0,2910	60	187,2945	60	12,7290
C.V.(%)		16,14		15,21		22,33		30,44		48,46

[1/] Observações transformadas segundo $\sqrt{(X + 0,5)}$; * e ** Significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.



$$Y = 1,346708 - 1,311925\ X_1 + 0,074922\ X_1^2 + 0,080191\ X_1X_2 + 2,312803\ \sqrt{X_1} - 0,003522\ X_1^2X_2 - 0,116088\ \sqrt{X_1}\ X_2 - 0,063887\ X_1\sqrt{X_2}$$

FIGURA 1 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormônios BAP e GA_3. UFLA, Lavras, MG, 1998.



$= 1{,}219206 + 0{,}180836\ X_1 - 0{,}019904\ X_1^2 - 0{,}080515\ X_1X_2 + 0{,}004286\ X_1^2X_2 + 0{,}126698\ \sqrt{X_1}\ X_2$

FIGURA 2 – Superfície de resposta para a característica número total de brotos em resposta às dosagens dos hormonios TDZ e GA_3. UFLA. Lavras, MG, 1998.

CONCLUSÃO

As melhores concentrações para as características avaliadas, corresponderam à ausência do hormônio GA_3 em associação com concentrações mínimas de BAP. As concentrações do hormônio BAP para as características nº total de folhas, peso fresco, nº total de brotos e peso seco foram 0,95, 0,96, 0,99 e 1,00 mg/l respectivamente. Os melhores resultados, para a característica nº de brotos maiores que 1,0 cm, foram obtidos quando as concentrações máximas de BAP e GA_3 foram utilizadas.

Na relação entre os hormônios TDZ e GA_3, para todas as características avaliadas, é recomendada a utilização da concentração máxima de GA_3 (20,00mg/l) associada às concentrações mínimas de TDZ variando de 0,84 a 0,98 mg/l. As concentrações que apresentaram os melhores resultados para TDZ, nas seguintes características, foram: peso fresco (0,84 mg/l), número de brotações (0,94 mg/l) e número total de folhas e brotos maiores que 1,0 cm (0,98 mg/l).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

building and response surfaces. New York: John Wiley e Sons, 1987. 669p.

CAMBRONY,H.D.; SNOECK,J. Hormones et regulateurs de croinance dans les cultures de caféiers et de cacaoyers. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v.**27**, n.2, p.113-119, 1983.

CUSTER,J.B.M.; van EE, G; BUIJS, L.C.; Clonal propagation on *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: **PROC. IX INTERN. SCIENT. CELL. COFFEE**. ASIC., London, p. 588 – 596, 1980.

DRAPER, N.R.; SMITH,H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley e Sons, 1981. 709p.

PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B. Cultura de embriões. In: **NOTICIAS DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS**, Brasilia, v.**2**, p.2-12. 1988.

SONDAHL,M.R.; NAKAMURA, T.;MEDINA Filho, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W:R: **Coffee**. In:Ammyrato e McMillen, eds. Handbook of plant cell culture. New York, p.564-590., 1984.

ZOK, S., DUBLIN, P. Multiplication Végétative in vitro par culture D'Apex chez Coffea arabica L. Action de Solutions Minerales et de Regulateurs de croissance. **Café, Cacao, Thé**, v. **14.**

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y AGRONÓMICA DE PLANTAS DE CAFÉ REGENERADAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Juan Carlos Herrera – Pinilla, Maria Eugenia Aponte - A

Disciplina Mejoramiento Genético y BiotecnologíaCentro Nacional de Investigaciones de Café – CENICAFÉ
Chinchiná, Caldas – ColombiaAA. 2427 Manizales. FAX.: (0968) 504723. E- mail: fcjher@cafedecolombia.com

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática a partir de tejido foliar representa un sistema modelo de regeneración de plantas que resulta particularmente atractivo para otras especies arbóreas. Desde los primeros experimentos realizados por Sondhal y Sharp (1977), la embriogénesis somática ha mostrado tener importantes aplicaciones no solo para la propagación vegetativa de diferentes cultivares, sino también en la conservación de recursos genéticos y en la diseminación de individuos seleccionados provenientes de cruzas intervarietales o interespecíficas (Dublin, 1991).
Aunque la propagación clonal vía embriogénesis somática se considera como un sistema bastante estable que permite la obtención de plantas genéticamente "idénticas", es bien conocida la existencia de una variación debida al proceso mismo y conocida como variación somaclonal. Esta variación somaclonal tiene dos componentes básicos: (i) la variabilidad natural presente en todas las células somáticas, y (ii) una variación debida a diferentes factores propios de la manipulación *In vitro* (Sondhal y Loh, 1985). La variación somaclonal se ha planteado como una interesante vía para obtener variantes en una especie de estrecha variabilidad genética como el café (Sondahl y Bragin, 1991), sin embargo, tal variación puede resultar inconveniente cuando se trata de establecer una vía de regeneración eficiente con miras a la propagación vegetativa de una variedad, o al desarrollo de un programa de transformación genética.
Desde hace cerca de 10 años, el laboratorio de biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFÉ) empezó a trabajar en la optimización del proceso de regeneración de plantas a partir de explantes foliares con miras a establecer un protocolo altamente eficiente y reproducible, con miras a su utilización en un futuro proyecto de transformación genética del café. Dentro de este trabajo se consideró importante conocer la estabilidad fenotípica y genotípica de los somaclones producidos pues de ella dependerá que la(s) característica(s) introducida(s) a las plantas transgénicas se mantengan y expresen adecuadamente una vez éstas sean llevadas al campo. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de comparar el desarrollo morfológico y el comportamiento agronómico de las plantas regeneradas a partir de embriogénesis somática directa (ESD) e indirecta (ESI), con respecto a plantas obtenidas por semilla y provenientes del mismo árbol donante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: Se estudiaron dos poblaciones de somaclones obtenidas de árboles de diferente generación de selección (F3 y F5) derivados del cruce entre *C. arabica* var. Caturra y el híbrido de Timor (CIFT 1343). Estos materiales constituyen progenies elite que están siendo evaluadas como posibles componentes de la variedad Colombia.

Regeneración de plantas vía embriogénesis somática: Se indujo la regeneración de los somaclones siguiendo las vía directa ó ESD (embriogénesis somática directa) e indirecta ó ESI (embriogénesis somática indirecta) descritas a continuación.
Para la inducción de la ESD los explantes fueron sembrados en un medio de inducción denominado L-3 y compuesto por las sales básicas de M&S (Murashige y Skoog, 1962) diluidas a la mitad y suplementadas con piridoxina (1 mg/l), tiamina (10 mg/l), ácido nicotinico (1 mg/l), inositol (100 mg/l), L- cisteína (37 mg/l), sacarosa (30 g/l), BAP: bencil amino - purina (3 mg/l) y agar DIFCO (8 g/l) como agente gelificante. EL pH fue ajustado a 5.8 antes de esterilizar. Luego de cuatro meses, los explantes se subcultivaron al medio LIQC-1 cuya composición es igual a la descrita para el medio LIQC-3 , con excepción de la concentración de BAP la cual se redujo a 1 mg/l.
Para la inducción de la ESI se utilizó un medio similar al L-3 pero con las siguientes variaciones: las sales de M&S fueron completas, y como reguladores de crecimiento se utilizó 2,4-D (2mg/l) y la kinetina (8 mg/l), esta última adicionada al medio luego de la esterilización, usando un filtro de 0.2 micrometros. Al cabo de

un mes en cultivo, el tejido indiferenciado fue transferido al medio L-3 para permitir la inducción final del tejido embriogénico.
z aparecieron los primeros embriones (140 días después), éstos se trasladaron a un medio de germinación sin hormonas. Después de dos meses en oscuridad, fueron transferidos a condiciones de luz (1500 lux, con un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad) para inducir la formación de las primeras hojas. Cuatro meses después las plántulas formadas fueron llevadas a condiciones de invernadero bajo cámara húmeda. Finalmente cada planta fue transferida a bolsa con una mezcla de suelo y pulpa (2:1), hasta que estuvieron listas para llevar al campo (aproximadamente 17 meses después de la siembra de los explantes).
Paralelamente con este proceso, se colocaron a germinar semillas provenientes del mismo árbol donante (población SEM), de manera que estuviesen listas para pasar al campo a una edad similar a la de las plantas provenientes del laboratorio.
Siguiendo los métodos antes descritos fue posible conformar dos poblaciones: una población *A* proveniente de un árbol F3 formada por 50 plantas de ESD y 50 de SEM; y una población *B* conformada por 62 plantas de ESD, 12 de ESI y 46 provenientes de SEM. Las dos poblaciones fueron sembradas en lotes separados, con una disposición de plantas al azar en la estación experimental "Naranjal" ubicada en el municipio de Chinchiná, Caldas (Colombia) a 1400 m.s.n.m. y con una temperatura media de 20.8°C.
Variables evaluadas: Cuando las plantas alcanzaron los dos años y medio de edad, se determinaron varios parámetros morfológicos tales como: altura, el número y longitud de los entrenudos, el índice foliar (relación largo / ancho de la hoja) y el ángulo de inserción de las ramas. Paralelamente se inició la evaluación agronómica de la producción (producción promedio por árbol y producción acumulada) de la cual se han completado dos ciclos correspondientes a los años 1996 y 1997. Igualmente, se determinó el porcentaje de granos normales (supremo) y defectuosos (vanos y caracoles) calculados a partir de dos muestreos realizados durante 1996 y 1997. Finalmente, se determinó el grado de incidencia de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), siguiendo la escala cualitativa desarrollada por Eskes y Toma-Braghini (1981) que permite medir la intensidad de ataque del hongo sobre el follaje utilizando una calificación que va desde 0 a 10, siendo 0 un estado de ausencia total del hongo (resistencia) y 10 el estado de máximo ataque (susceptibilidad)

Análisis estadístico Tanto para la población de clones derivados de una planta F3 (población A) como la derivada de una F5 (población B), se realizaron análisis de varianza a fin de comparar el comportamiento de cada variable (fenotípica o agronómica) entre las plantas de diferente origen (ESD, ESI y SEM) siempre a un nivel de significancia del 5 %. Para el análisis de resistencia a la roya se establecieron tres grupos de susceptibilidad de acuerdo al grado de incidencia (0, 1-4, >4). Utilizando la prueba de chi-cuadrado (al 5% de significancia), se comparó la proporción de plantas perteneciente a cada grupo, entre los diferentes tipos de plantas estudiadas para cada población.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación fenotípica: En las tablas 1 y 2 se presentan los resultados de la evaluación fenotípica de las plantas pertenecientes a las dos poblaciones estudiadas. No se encontraron diferencias significativas para las variables altura, ángulo de inserción de la rama e índice foliar entre los somaclones (ESD, ESI) y las plantas de semilla pertenecientes a las poblaciones A y B. Diferencias estrechas pero significantes fueron detectadas para el número de nudos y la longitud de los entrenudos, sin embargo el comportamiento de estas dos variables fue diferente para cada población, mostrando un efecto adicional de otros factores diferentes al tratamiento mismo. Es posible que las diferencias en las épocas de siembra y en el tipo de generación (F3 o F5) entre cada población hayan incidido en las diferencias ya mencionadas.
En lo que respecta al color de los frutos y de los brotes foliares jóvenes, no se detectaron cambios para ninguno de los tipos de plantas evaluadas. En todos los casos, las semillas fueron de color rojo mientras los brotes mostraron una tonalidad bronce clara.

Tabla 1. Características morfológicas evaluadas para la población A derivada de una planta F3 proveniente del cruce entre *C. arabica* var. Caturra X Híbrido de Timor. Comparación de parámetros estadísticos obtenidos para plantas derivadas de semilla (SEM) y de embriogénesis somática directa (ESD).

VARIABLE	Tipo de planta	Número de Plantas	Promedio	Intervalo de onfianza[1/]
Altura	SEM	49	169.6	138.7 - 200.5
(cm)	ESD	46	168.0	140.3 - 195.8
Número de	SEM	49	34.5	28.8 - 40.2
Nudos	ESD	46	36.1 **	30.9 - 41.3
Longitud de los	SEM	49	4.9 **	4.4 - 5.4
entrenudos (cm)	ESD	46	4.6	4.1 - 5.1
Angulo de Inserción de	SEM	49	58.3	51.5 - 65.1
las ramas (grados)	ESD	49	58.4	52.7 - 64.1
Indice Foliar	SEM	49	2.5	2.3 - 2.7
	ESD	49	2.4	2.2 - 2.7

1/ Valores estimados al nivel de 0.05 de probabilidad / ** Diferencias estadísticamente significativas según prueba t-student al 0.01 de probabilidad.

Tabla 2. Características morfológicas evaluadas para la población B derivada de una planta F5 proveniente del cruce entre *C. arabica* var. Caturra X Híbrido de Timor. Comparación de parámetros estadísticos obtenidos para plantas derivadas de semilla (SEM), de embriogénesis somática directa (ESD) e indirecta (ESI).

VARIABLE	Tipo de planta	Número dePlantas	Promedio	Intervalo de confianza [1/]
Altura	SEM	46	175.5 a [2/]	172 – 179
(cm)	ESD	62	172.9 a	170 – 176
	ESI	12	174.5 a	167 – 182
Número de	SEM	46	38.4 a	37.7 – 39.2
Nudos	ESD	62	36.2 b	35.5 – 36.8
	ESI	12	37.5 ab	36.1 – 38.9
Longitud de los	SEM	46	4.69 b	4.61 - 4.76
entrenudos	ESD	62	4.85 a	4.78 - 4.91
(cm)	ESI	12	4.65 ab	4.51 - 4.80
Angulo de Inserción	SEM	46	54.13 a	53.2 – 55.1
de las ramas (grados)	ESD	62	52.82 a	52.0 – 53.6
	ESI	12	53.08 a	51.3 – 54.9
Indice Foliar	SEM	46	2.46 a	2.44 - 2.49
	ESD	62	2.49 a	2.47 - 2.51
	ESI	12	2.52 a	2.47 - 2.57

1/ Valores estimados al nivel de 0.05 de probabilidad

2/ Promedios con letra distinta son estadísticamente diferentes al 0.01 de probabilidad

Tabla 3. Producción media de las plantas regeneradas por los diferentes métodos (ESD, ESI y SEM) y pertenecientes a las dos poblaciones estudiadas. Los datos corresponden a 2 ciclos (años) de evaluación.

Población	Tipo deplanta	Número de plantas	Producción (Kg de c/árbol)	Varianza
Población A (F3 de	SEM	50	5.87	3.539
caturra X H. de Timor)	ESD	50	5.88	3.264
Población B(F5 de	SEM	46	4.45	1.073
caturra X H. de Timor)	ESD	62	4.30	0.925
	ESI	12	4.49	0.481

Evaluación agronómica : Producción: Se evaluó La producción promedio por árbol y la producción promedio total por tratamiento para lo clones derivados de un árbol F3 de Caturra X Híbrido de Timor (población A) y los clones derivados de un árbol F5 de Caturra X Híbrido de Timor (población B) y los respectivos testigos obtenidos por semilla. No se detectaron diferencias significativas entre los clones obtenidos por ESD y ESI, con respecto a las plantas derivadas de semilla, al cabo de dos ciclos completos de producción (tabla 3; figuras 1a y 1b).

Tabla 4. Características de grano evaluadas para las plantas regeneradas por los diferentes métodos (ESD, ESI y SEM) y pertenecientes a las dos poblaciones estudiadas. Los datos corresponden al promedio de dos muestreos realizados entre 1996 y 1997.

Población	Variable	Tipo de planta	Número de plantas	Promedio (%)	Varianza
Población A (F3 de Caturra X H. de Timor)	Grano vano	SEM	48	19.07	132.09
	Grano	ESD	47	31.23 **	15.96
	caracol	SEM	48	12.24	2.96
	Grano	ESD	47	12.88	3.75
	supremo	SEM	48	68.77	48.00
		ESD	47	71.20	45.38
Población B (F5 de Caturra X H. de Timor)	Grano vano	SEM	44	4.7	4.791
	Grano	ESD	62	4.5	4.967
	caracol	ESI	12	5.7	62.858
	Grano	SEM	44	12.6 **	5.127
	supremo	ESD	62	10.5	3.61
		ESI	12	9.2	1.697
		SEM	44	79.2	33.017
		ESD	62	79.5	17.925
		ESI	12	77.3	17.722

**** Diferencias estadísticas al nivel de probabilidad del 0.01.**

Como se esperaba, se encontró una mayor variación en la producción promedio por árbol de los individuos obtenidos por semilla pertenecientes a la población A (32.04%) respecto a la B (23.3%). Este resultado tiene su explicación en la heterozigocidad remanente que presentan las plantas de la población A ya que derivan de un árbol F3 (hetrozigocidad esperada 12.5 %), mientras que los individuos de la población B provienen de semilla F5 (heterozigocidad esperada de 3.1 %).

Características de grano: Los datos del porcentaje de granos normales (supremo) y anormales (vanos y caracoles) para las plantas de las poblaciones A y B se presentan en la tabla 4.
No se encontraron diferencias significativas para porcentaje de grano supremo entre los somaclones y las plantas de semilla en ninguna de las dos poblaciones estudiadas. Al observar la distribución del porcentaje de los diferentes tipos de grano se pudo observar el efecto de la selección a favor de los individuos de grano tipo supremo (figuras 1b y 2b).
Las diferencias significativas observadas entre los somaclones y las plantas de semilla para el porcentaje de granos vanos (población A) y porcentaje de granos caracol (población B), muestran nuevamente un posible efecto del genotipo y de la época de siembra sobre estas variables.

Resistencia a roya: La resistencia a roya es una variable de gran importancia agronómica y por tanto cualquier cambio en los genes responsables de dicho carácter, debido al proceso de clonación, podría ser negativo al momento de utilizar este sistema en la obtención de nuevas variedades. Los datos obtenidos hasta hoy en las dos poblaciones analizadas, muestran que la vía de regeneración (ESD o ESI) no afecta de manera alguna la resistencia de estas plantas a la roya y que tal como se esperaba, los clones muestran igual comportamiento que las plantas derivadas de semilla.
La población A presentó un porcentaje similar de plantas ESD y SEM similar (figura 1c) y distribuido en dos grupos bien diferenciados: plantas parcialmente resistentes (calificación 1-4) y plantas susceptibles (calificación >4). Esta distribución refleja la variación que aun persiste en estas plantas de generación F3, con respecto a esta variable. La población B por su parte mostró un comportamiento diferente. Tanto los somaclones como las plantas de semilla se agruparon como plantas parcialmente resistentes, lo cual se explica por la selección intensa que se ha ejercido sobre estos materiales de generación F5 (figura 2c).
Uno de los pocos estudios referentes a la variación somaclonal en café es el publicado por Söndahl y Bragin (1991). En él se reportan diferentes frecuencias de variación somaclonal para una población de 12.176 plantas regeneradas a partir de embriogénesis somática de alta y baja frecuencia en distintos genotipos de *Coffea arabica*. Según éstos autores, un 10 % de las plantas presentaron una variación en características como la morfología de la hoja, la estatura de la planta, el color, tamaño y forma del fruto, asi como para algunas otras variables relativas a la producción, tiempo de maduración

del fruto y la tolerancia o susceptibilidad a ciertas enfermedades. Las frecuencias de variación reportadas en ese trabajo oscilaron entre 0,01 % (para la variable "grano maragogipe") y el 42,3 % (para la mutación de grano amarillo a grano rojo). La comparación entre estos resultados y los obtenidos en nuestro ensayo, debe tomarse con cautela debido a que el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento utilizados por Söndahl y Bragin fueron diferentes a los empleados en nuestro laboratorio. De hecho, su intención de inducir variabilidad en los materiales regenerados, se refleja en el uso de concentraciones relativamente altas de auxina (1,1 mg/l de 2,4-D) y citoquinina (4,3 mg/l de cinetina). Actualmente existe suficiente evidencia que muestra que la variación somaclonal esta influenciada por el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento incluidos en el medio. Se sabe que el empleo de este tipo de sustancias conlleva el riesgo de variaciones a nivel de la estructura y el número de los cromosomas, afectando en forma transitoria o permanente la estabilidad fenotípica y genotípica de las plantas regeneradas, en especial en aquellas especies perennes como el café, donde el tiempo comprendido entre dos generaciones se hace muy largo (Karp, 1992; Karp, 1995).

CONCLUSIONES

El estudio morfológico de las dos poblaciones de plantas analizadas, muestra que, siguiendo los protocolos establecidos en CENICAFÉ, el proceso de regeneración vía embriogénesis somática directa (ESD) o indirecta (ESI), no induce cambios significativos en la altura, el ángulo de inserción de las ramas o el índice foliar. Asi mismo, características agronómicas importantes como la producción media por árbol, el porcentaje de granos normales (tipo supremo) y la resistencia a la roya de los clones regenerados por embriogénesis somática, tanto directa (ESD) como indirecta (ESI), mostraron ser iguales a las de plantas obtenidas por semilla. Este comportamiento fue similar para las dos poblaciones estudiadas.

De otra parte, tanto las características del grano como la resistencia a la roya reflejaron las diferencias en la intensidad de selección aplicada sobre las dos poblaciones analizadas (F3 y F5) siendo, sin embargo, similar su comportamiento para los clones y para las plantas donantes derivadas de semilla.

Las bajas concentraciones hormonales utilizadas durante las fases de inducción y crecimiento, así como la reducción significativa en el tiempo total de desarrollo *In vitro*, parecen ser los factores responsables de la mínima variación somaclonal observada hasta hoy. Esta información será de gran importancia para el proyecto de transformación genética en el que, los materiales transformados, deberán ser regenerados por ésta vía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aponte A., M.E. 1993. Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants from crosses of *Coffea arabica* by Timor hybrid. Memorias XV Coloquio Científico Internacional sobre Café, ASIC. p. 82-88. Montpellier, Francia.

Dublin P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. *IN:* Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M.; Mroginski, L. A. (Eds). Cap. 26. P.577-619. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Colombia.

Eskes, A. B.; Toma-Braghini, M. 1981. Assesment methods for resistance to coffee leaf rust *(Hemileia vastatrix)*. FAO, Plant Prot. Bull., 29, 56.

Karp, A., 1992. The role of growth regulators in somaclonal variation. British Society for Plant Growth Regulation Annual Bulletin N° 2. May 1992, p. 1-9.

Karp, A., 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica 85: 295-302.

Sondahl M. R.; Sharp, W.R. 1977. High frecuency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 81: 395-408.

Sondahl M. R.; Loh W. H.-T. 1985. Coffee biotechnology. *IN:* Coffee. Clarke R.J.; Macrae R. (Eds). Agronomy, Vol 4. p. 235-262. Elsevier Applied Sciences Publ. London, UK.

Sondahl M. R.; Bragin, A. 1991. Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. Memorias XIV Coloquio Cientifico Internacional sobre Café, ASIC. p. 701-709. San Francisco, Estados Unidos.

A MODEL FOR THE STUDY OF VARIATION INDUCED BY TISSUE CULTURE ON COFFEE.

Fuentes-Cerda, C. F. J., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas-Herrera*, J. Mijangos-Cortés and V. M. Loyola-Vargas.

Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43, No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yuc. México. C. P. 97200. * Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Gaveta Postal 1. San José de las Lajas, La Habana. Cuba.

ABSTRACT

Coffee (Coffea spp.) is one of the most important agricultural commodities in the world. C. arabica and C. canephora are the principal varieties of the genus. Staritsky (1970) firstly described somatic embryogenesis in C. canephora in 1970 and in C. arabica by Söndal & Sharp in 1977. Both systems are based in the use of growth regulators (auxins and citokynines) to induce a de-differentiation stage and the formation of calli. We had modified the protocol descibed by Yasuda et al., (1985) to create a model that allow us: 1) to use "in vitro" cultured plants as starting material and thus generate lines from selected plants, 2) the inducción of direct somatic embryogenesis avoding the callus stage and 3) a rapid responding system (globular embryos are obtained at day 22) in contrast with other systems where the obtention of embryos take 2 or 3 months. Histological studies using this system had shown that embryos are originated directly from explant cell rather that from callus. When we analyzed regenerated plants, we could not find any somaclonal variation at molecular level.

INTRODUCTION

Coffee (*Coffea* spp.) is one of the most important agricultural commodities of the world. *C. arabica* and *C. canephora* are the main commercial species of the genus. *In vitro* somatic embryogenesis of *C. canephora* was first reported by Staritsky (1970), who described the induction of callus tissue from orthotropic internodes; later, Herman and Hass (1975) obtained somatic embryogenesis in *C. arabica* from callus cultures derived from leaf explants. Söndahl and Sharp (1977, 1979), developed a two phases experimental protocol for somatic embryogenesis from leaves of *C. arabica* var. "Bourbon". Dublin (1981) reported somatic embryogenesis from leaf explants of Arabusta using a medium with cytokinins but without auxins. Yasuda *et al.*, (1985) induced embryogenic calli from *C. arabica* var. "Typica" leaf explants using 5 µM benzylamino purine (BAP), white and friable calli were obtained after 16 weeks and somatic embryos were obtained four weeks following calli initiation.

Vigorous research using both *C. canephora*, and *C. arabica*, has allowed the use of different explants such as orthotropic stem fragments, plagiotropic branches, leaves, ovule coverings for the development of somatic embryogenesis systems (Dublin, 1980a; 1980b; 1981). Leaves has proved to be the best explants for this purpose. The systems proposed by Dublin (1980a; 1980b; 1981) and Söndahl and Sharp (1977, 1979) are among the most successful; in both methods indirect somatic embryogenesis in leaves explants from mature trees is promoted.Our protocol describes a simple one step system for the induction of direct somatic embryogenesis of *C. arabica* that poses important advantages.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Seeds of *C. arabica* cv. "Caturra Rojo" were collected from several productive plots at Chiapas, Mexico. Seeds were washed and soaked during 24-48 hours in sterile distilled water, disinfested with 6% sodium hipochlorite for 20 minutes and finally rinsed with sterile water. The culture medium employed for zygotic embryos germination was MS (Murashige and Skoog, 1962), with thiamine (29.6 µM), myo-inositol (0.555 µM), biotin (0.41 µM), L-cysteine (0.15 µM), glucose (166.48 mM), NAA (0.53 µM), Kin (2.32 µM) and Gelrite® (0.25%); pH was adjusted to 5.7 before autoclaving (20 min, 110°C). Ten embryos were placed on each Magenta® plastic box. Culture conditions were photoperiod (16 h/8 h) and 25°C.

Plantlets Culture. Plantlets were grown in Magenta® boxes, containing 40 mL of MS medium, with thiamine (11.86 µM), myo-inositol (0.56 µM), L-cysteine (0.16 µM), sucrose (87.64 mM), NAA (0.54 µM), Kin (2.32 µM) and Gelrite® (0.25%); pH was adjusted to 5.8 before

autoclaving (20 min, 110°C). Culture conditions were photoperiod (16 h/8 h) and 25°C. Plantlets were transferred to fresh medium every 90 days.

Somatic Embryogenesis Induction. Leaf fragments (0.25 cm^2) were cultured in the medium previously described by Yasuda *et al.*, (1985), using two different gelling agents (Agar 0.9% and Gelrite® 0.25%). Culture conditions were photoperiod (16 h/8 h) at 25°C.

Histology. Foliar explants were collected for 60 days under induction conditions, fixed and stored in FEA (formol, ethanol, acetic acid). They were dehydrated with ethanol, embedded in JB-4 resin, sectioned and stained with toluidine blue.

RESULTS

Model Description. Our results have allowed to propose a new model for somatic embryogenesis in coffee, which is described in figure 1.

Scarring was observed at injured edges within the first two weeks and between the third and fourth, globular somatic embryos were observed in the edges of explants.

Histological studies have showed the formation of proembryos directly from cells rather than from the callus. Although Dublin (1981) had reported direct somatic embryogenesis from Arabusta (*C. arabica* x *C. canehora*), no histological evidence supported his results. As can be seen in figure 2 (A, B, C), proembyos originated from the mesophyll cells and in some rare cases, from epidermal cells (Fig. 2D). Indirect embryo formation was also observed from microcalli (Fig. 2E).

Given the use of *in vitro* germinated plantlets as explants, our work radically differs from that of Yasuda *et al.*, (1985) where adults plants were used. Furthermore the endogenous content of growth regulators could differ drastically between adult plants and *in vitro* plantlets leading to the spectacular results.

At the moment, it would be far-fetched to assign a biotechnological application for this system (low yields); but it can be an excellent approach to study the biochemical and molecular events that lead embryo formation. This model also provides a unegualed opportunity to study somaclonal variation in coffee embryogenesis.

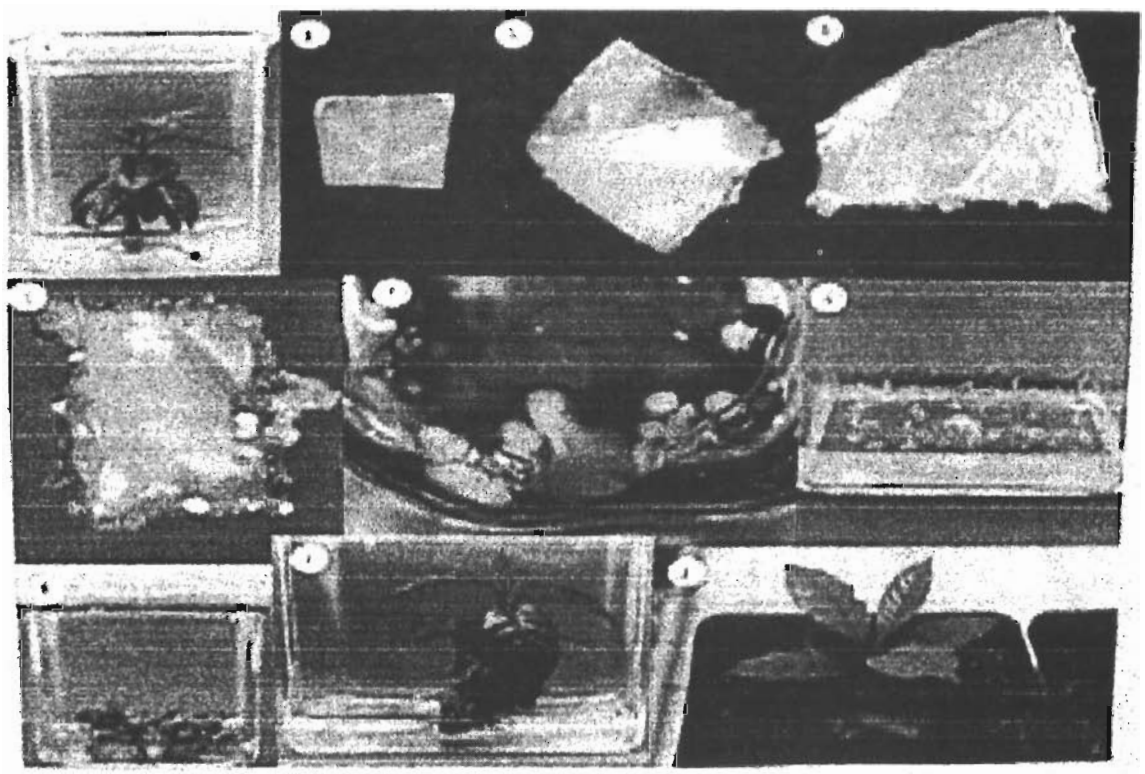


FIG. 1

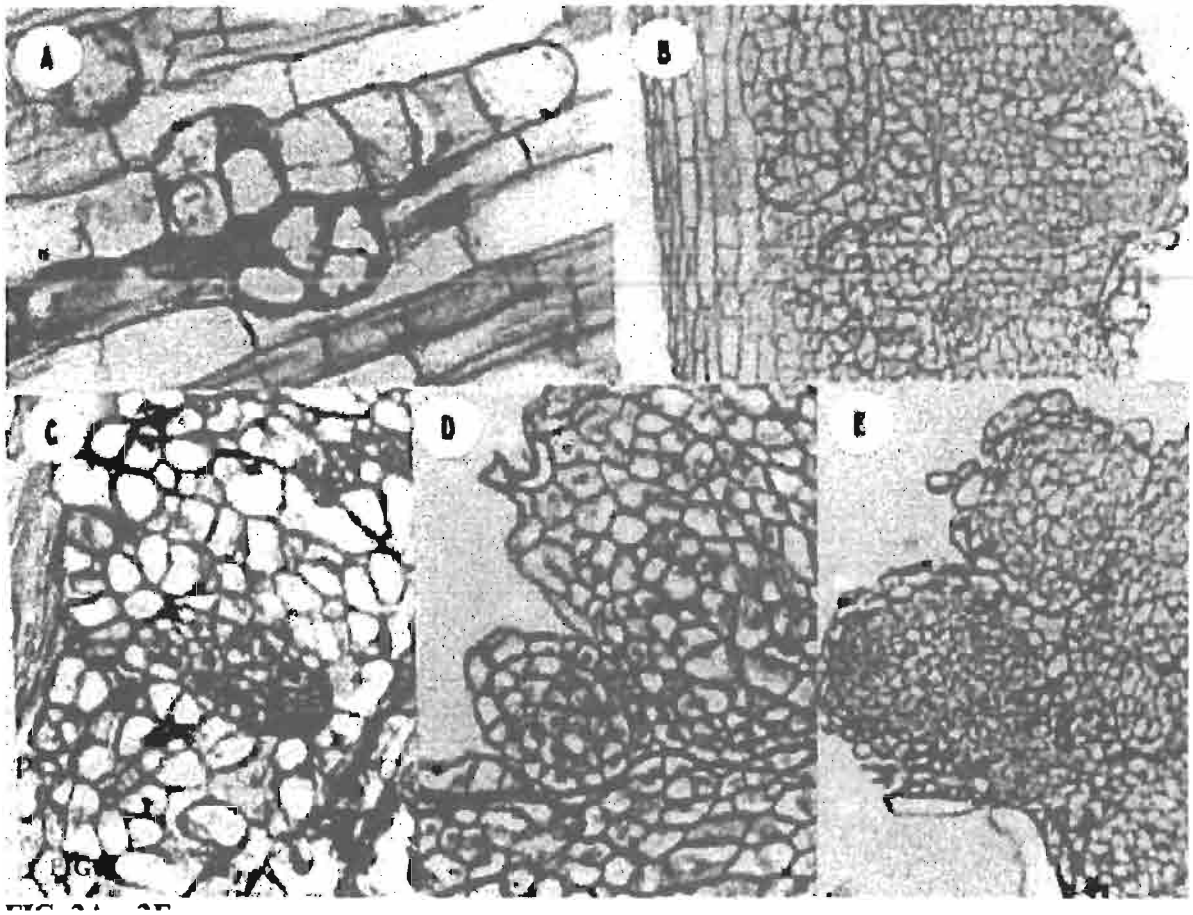


FIG 2

Effect Of Genotype And Origin Of The Explants. Plantlets from zygotic and somatic origin were tested and showed a differential response. There was a better response in somatic plantlets, as has been previously reported for other species.The position of the leaf in the plant and of explant in the leaf had a strong effect on the response (Figure 3). The leaf number 3 showed the best results to the induction of somatic embryogenesis, while explants obtained near the apex showed a disminished response compared to those obtained from the base of the leaf.

Nitrogen Source. Since the early 60s, it is known that the nitrogen source has an important effect on plant differentiation. The total nitrogen, the nitrate/ammonium ratio and the type of the nitrogen source have a deep effect on the response of the explants to the somatic embryogenesis process. However, the effect of nitrogen source on somatic embryogenesis has not been studied in coffee.

As the total nitrogen in the medium increased, the response to somatic embryogenesis decreased (Fig. 4A). A 60 mM nitrogen concentration had a strong inhibitory effect, while with the lowest concentration, the response was maximal. The nitrate/ammonium ratio also modified the response. The presence of ammonium is essential to obtain a response and nitrate has an inhibitory effect (Fig. 4B). In fact, both nitrogen sources are essential to induce the phenomenom.

When the effect of the nitrogen source was measured 100 days after the induction the effect of the nitrogen source on the response, the total number of embryos and the number of embryos per explant was clear (Fig. 5A & B).

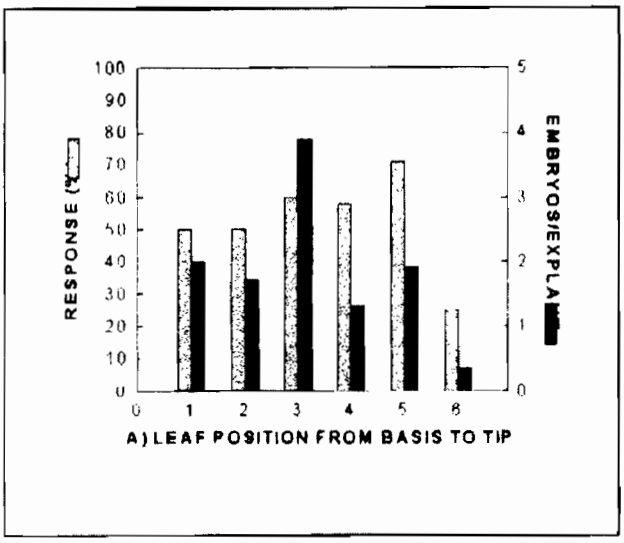


FIG 3A

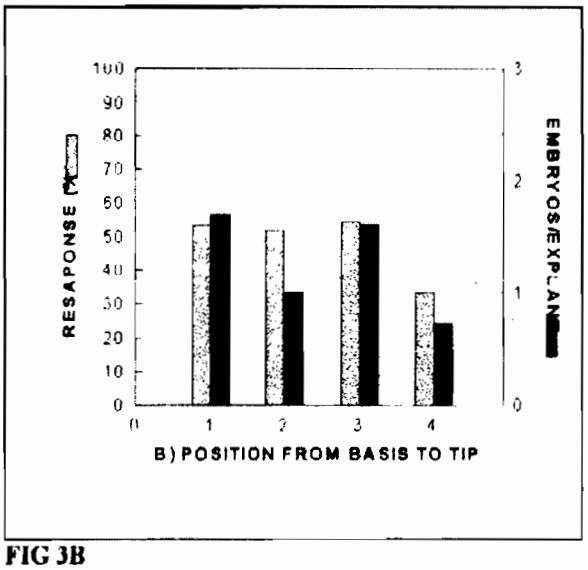


FIG 3B

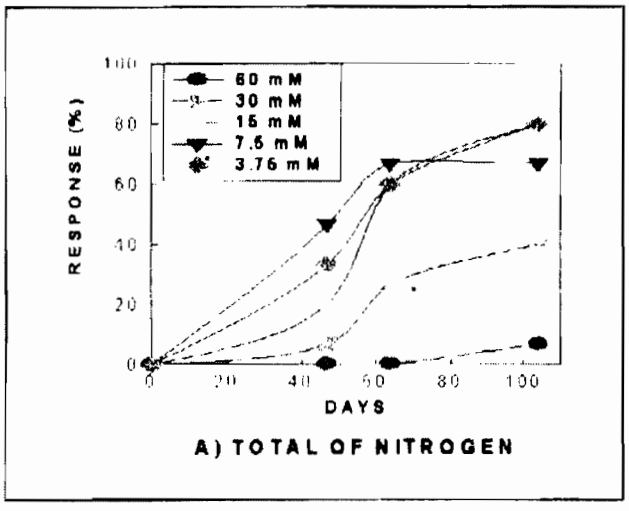


FIG 4A

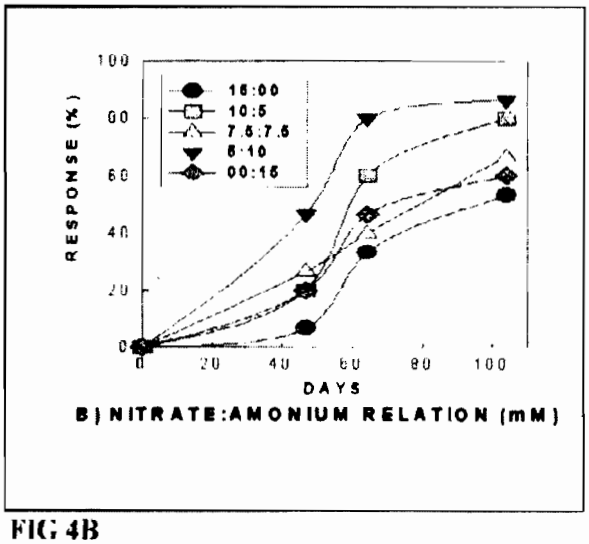


FIG 4B

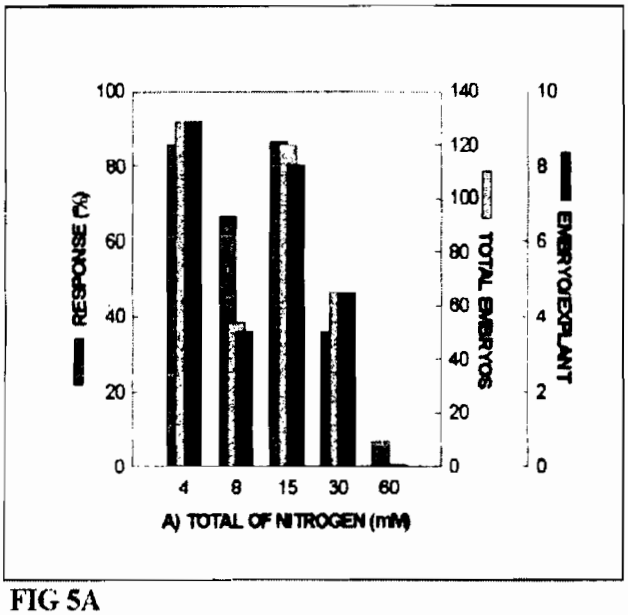


FIG 5A

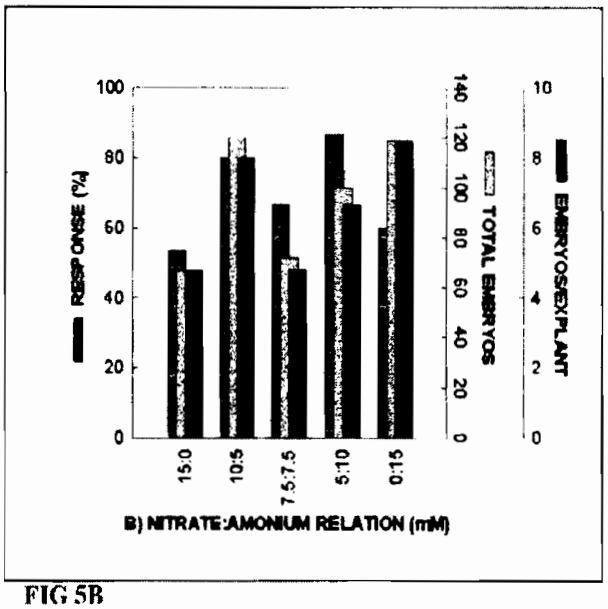


FIG 5B

CONCLUSIONS

Direct somatic embryogenesis is the formation of somatic embryos from the explant whithout the formation of an intermediate calli phase (Raghavan 1986). The production of callus is usually undesirable if embryogenesis is the goal of the research. Unfortunately, in most plants direct somatic embryogenesis is difficult to obtain. This process in leaves does not happen frecuently. Conger *et al.*, (1983) and Trigiano *et al.*, (1989) have reported direct somatic embryogenesis from leaves of *Dactylis glomerata* and Dubois *et al.*, (1991) in *Cichorium*. Dublin (1981) reported somatic embryogenesis from leaf explants of Arabusta using a medium with cytokinin, but no auxins. To our knowledge this is the first report of direct somatic embryogenesis from explants of leaves in *Coffea arabica* supported by histological evidence. We had modified the protocol described by Yasuda *et al.* (1985) to create a model that allows us: to use *in vitro* cultured plants as starting material and thus generate lines from selected plants,
a fast and responsive system (globular embryos are obtained at day 22) in contrast with other systems where embryos take 2 or 3 months to develop.

REFERENCES

Conger, B.V., Hanning, G.E., Gray, D.J., Mc Daniel, J.K. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. Science 221: 850-851, 1983.

Dublin, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. Café Cacao Thé XXV (4):237-242, 1981.

Dublin, P. Induction de bourgeons néoformés et embryogenése somatique. Deux voies de multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés. Café Cacao Thé XXIV (2):121-130, 1980.

Dublin, P. Multiplication végétative in vitro de l'Arabusta. Café Cacao Thé XXIV (4):281-290, 1980.

Dubois, T., Guedira, M. and Vasseur, J. Direct somatic embryogenesis inleaves of Cichorium. A histological and SEM study of early stages. Protoplasma 162:120-127, 1991.

Herman, E.B. and Haas, G.H. Clonal propagation of Coffea arabica L. from callus culture. HortScience 10 (6):588-589, 1975.

Raghavan, V. Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

Söndahl, M. R. and Sharp, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of Coffea arabica L. Z. lanzenphysiol. 81:395-408.

Söndahl, M. R. y Sharp, W. R. 1979. Research in Coffea spp., and applications of tissue culture methods. In Sharp, W.R., Lersen, P.O., Paddock, E.F., Raghavan, V. (eds.) Plant cell and tissue cultures, principles and applications . Ohio State Univ. Press. Columbus. pp 527-584

Staritsky, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot.Need. 19:509-514, 1970.

Trigiano, R.N., Gray, D.J., Conger, B.V., Mc Daniel, J.K. Origin of direct somatic embryogenesis from cultured leaf segments of Dactylis glomerata. Bot. Gaz. 150: 72-77.

Yasuda, T., Fujii, Y., Yamaguchi, T. Embryogenic callus induction from Coffea arabica leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26 (3):595-597, 1985.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks Drs. Teresa Hernández and Lourdes Miranda for the revision of the English version of the manuscript. The work of the authors has been supported by CONACYT, México, grant 4123P-N and Consejo Mexicano del Café.

STANDARDIZATION OF ENCAPSULATION TECHNIQUE FOR PRODUCING SYNTHETIC SEEDS IN COFFEE

B. Muniswamy And H L. Sreenath

Biotechnology Centre Unit of Central Coffee Research Institute Coffee Board, Manasagangothri, Mysore-570 006, INDIA

SUMMARY

Plant regeneration from encapsulated zygotic and somatic embryos of coffee is reported. The somatic embryos obtained directly from cultured zygotic embryos of CxR cultivar of robusta coffee on MS medium supplemented with NAA and BAP and zygotic embryos of C. arabica were used in the study. They were encapsulated in six percent sodium alginate in MS salts solution by dropping them into two percent calcium chloride solution. The resulted alginate beads with embryos were cultured both in-vitro on MS medium and ex-vitro in potted vermiculite. Fast germination and plantlet development was achieved on half-strength MS medium supplemented with 0.1 mg/l or 0.5 mg/l of Kn or 0.1mg/l BAP. When the plantlets produced 3-4 pairs of leaves with good root system, they were hardened with a good survival rate. The encapsulated embryos that were sown directly ex-vitro in vermiculite could not be regenerated into plantlets. Importance of the encapsulation technique for producing synthetic seeds in coffee are discussed.Abbreviations: BAP- 6-Benzylamino purine, Kn - Kinetin, MS-Murashige and Skoog (1962) NAA - 1-Napthalene acetic acid

INTRODUCTION

Seeds are the primary means of propagation in many crops. The use of genetically uniform tissue culture derived plants, would be advantageous in plants like coffee, in which vegetative propagation is used to raise uniformly superior clonal plantations. Micropropagation technique is greatly constrained due to the high cost involved and inadequate standardization of hardening procedures. During transfer of plants from laboratory to field, generally high mortality rates result that further lower the efficacy of results achieved *in-vitro* (Mathur *et al*, 1989). For these reasons, efforts have been made for overcoming the constraints by encapsulating somatic embryos (Kitto and Janick, 1985; Redenbaugh *et al.* 1987) in different matrices and attempting to grow them on different media. Studies on somatic embryogenesis and related encapsulation of somatic embryos has been reported by Redenbaugh *et al*, (1993). The first succesful examples of synthetic seed technology was in alfalfa and celery. Fujii *et al.* (1989) could grow plants from synthetic seeds of alfalfa planted directly in the field at low frequency. Kirin Brewery Co Ltd., Japan and Plant Genetics Inc. USA conducted field trails in Japan with 20,000 F_1 synthetic seeds in 1988 (Sanada *et al.* 1993). Recently, Rao *et al.* (1998) reviewed the concept, methods and applications of synthetic seeds.

In coffee, somatic embryogenesis has been successfully achieved from different tissues (Sondahl and Loh, 1988; Sreenath and Naidu 1997; Muniswamy and Sreenath 1997). However, reports on encapsulation studies and subsequent plant regeneration for producing synthetic seeds in coffee are very much limited. In our laboratory, plant regeneration from encapsulated zygotic and somatic embryos of coffee is reported. This technique has tremendous use in the large scale micropropagation and conserving encapsulated zygotic and somatic embryos in liquid nitrogen (at -196^0 C) for long term preservation of coffee germplasm.

MATERIALS AND METHODS

Material Source

The somatic embryos were regenerated directly from the cultured zygotic embryos of CxR cultivar of robusta coffee (an interspecific hybrid between *C. congensis* and *C. canephora)* were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of NAA and BAP and zygotic embryos of *C. arabica* (S.4348 and S.2794). These embryos were cultured on MS medium with ABA (1 mg/l) for 30 days for embryo maturation and then used in the encapsulation study.

Preparation of encapsulation matrix Different concentrations of sodium alginate and calcium chloride were studied. Sodium alginate (2-6%) was added to MS salts solution, supplemented with 3% sucrose and with or without growth regulators. pH of the medium was adjusted between 5.6 and 5.8 and medium was sterilized in a domestic pressure cooker. For an exchange reaction between Na^+ and Ca^{++} resulting in the formation of insoluble calcium alginate (i.e., complexation) two percent of calcium chloride was prepared.

Formation of beads

The embryos mixed with sodium alginate solution were dropped through a pasteur pipette into two percent calcium chloride solution in a flask, placed on a magnetic stirrer with continuous stirring. The resulting beads containing entrapped embryos were left as such in the calcium chloride solution for 30 minutes for complexation. The beads were separated from the solution by using sterilized stainless steel sieve. The beads ranging between 4 - 6 mm in diameter were placed on different media for germination and subsequent plantlet development.

Culture media

The encapsulated embryos were cultured both *in-vitro* on medium and *ex-vitro* in potted vermiculite for germination. For *in-vitro* germination, MS medium supplemented with 0.1 or 0.5 mg/l of Kn or 0.1 mg/l of BAP with 3% sucrose was used. The pH of the medium was adjusted between 5.6 - 5.8, solidified with 0.8% bacteriological agar and then sterilized in pressure cooker for 20 minutes. The cultures were incubated at room temperature with 70 - 80% relative humidity under a photo period of 12 h (around 2000 lux) using cool white fluorescent tubes. For *ex-vitro* germination of the encapsulated embryos, finely sieved sterile vermiculite filled in the plastic pots was used.

RESULTS AND DISCUSSION

***In-vitro* germination**

Among different concentrations of sodium alginate and calcium chloride tested, six percent sodium alginate and two percent calcium chloride solutions gave optimal, firm and round beads with a complexation period of 30 minutes.

Somatic embryos obtained directly from the zygotic embryos of CxR cultivar of coffee at high frequency on 0.1 mg/l of NAA and 1 mg/l of BAP were used for encapsulation. The non-encapsulated embryos cultured on half-strength MS medium with 0.1 mg/l of Kn and 0.1 mg/l of BAP, started germinating and developed into plantlets with long hypocotyls, green cotyledonary leaves and roots. However, when the embryos were encapsulated with half strength MS salts solution with or without cytokinin and cultured on half-strength MS medium supplemented with different concentrations of Kn (0.1 or 0.5 mg/l) and BAP (0.1 mg/l), they started germinating with elongation of hypocotyl and developing the cotyledonary leaves after 30-40 days of culture period. (Fig. 1A). Later, these plantlets grew further with thick greenish hypocotyl of 7 to 11 mm long and 6-12 mm wide well developed dark green cotyledonary leaves about 6 - 12 mm wide. Most of them have produced first pair of leaves and good roots after three months culture. The details of media and comparison of plant development from non-encapsulated and encapsulated embryos are given in the **Table 1**.

After 2-3 subcultures on half-strength MS medium supplemented with Kn (0.1or 0.5 mg/l) and BAP (0.1 mg/l) at 30-45 days intervals, plantlets developed further and produced 2-5 pairs of additional leaves with long shoot and good roots (Fig. 1B). At this stage, plantlets were taken out from culture vessel without damaging the roots and planted in potted vermiculite for hardening. These plantlets were watered with 1/8 strength MS salts on alternate days and established with a good survival rate. After two months growth in pots, hardened plantlets were planted in polybags filled with soil mixture.

Ex-vitro germination Encapsulated embryos sown directly in potted vermiculite did not germinate, they turned brown and died within 2 weeks. They were watered with 1/8 strength MS salts solution on alternate days and sprayed with 0.1% Bavistin once in a week for avoiding fungal growth.

Though, germination and plantlet development was achieved in both encapsulated and non-encapsulated embryos, the encapsulated embryos germinated faster and developed into good, healthy plantlets with dark green leaves. There were clear differences in respect of germination and plantlet development between non-encapsulated and encapsulated embryos. The encapsulated embryos responded better when they were cultured initially on half-strength MS medium supplemented with 0.5 mg/l of Kn for one month and subcultured subsequently on medium of same composition with reduced concentration of Kn (0.1 mg/l). The time taken for plantlets to reach hardening stage was reduced by two to three months in encapsulated embryos as compared to non-encapsulated embryos. However, germination and plantlet development could not be achieved from the encapsulated somatic embryos directly sown *ex-vitro*. Encapsulation technique is useful for producing synthetic seeds in coffee by using somatic embryos. This would help in scaling up micro propagation and for germplasm conservation through cryopreservation.

In trees species, development of synthetic seeds is valuable because of the need for vegetative propagation and lack of cost effective methods (Redenbaugh *et al*, 1988). Kamada (1985) also

suggested that application of synthetic seeds will depend on the viable, efficient *in-vitro* culture system. Synthetic seed is a new concept in seed biotechnology research and is mainly considered for propagation and delivery of tissue cultured plants in a more economical and convenient way (Rao *et al* .1998).

Table-1: Comparison of germination and plant development from encapsulated and non-encapsulated embryos of coffee (data taken after 3 months)

	Medium	No. of embryos cultured	No.of embryos germinated	Average length of hypocotyl (cm)	Breadth of cotyledonary Leaves (cm)	No.of plants produced 1st pair of Leaves	No. of plantlets produced roots.
Non-encapsulated embryos	½ MS+Kn (0.1mg/l	30	24 (80)	0.6	0.3-0.4	1 (3.33)	11 (36.7)
	1/2MS+Kn (0.5mg/l)	30	24 (80)	0.8	0.6-0.9	3 (10)	13 (43.3)
Encapsulated with ½ MS basal medium	1/2MS+Kn (0.5mg/l)	25	20 (80)	0.8	0.7-1.2	5 (20)	10 (40)
	Potted vermiculite	25	0	0	0	0	0
	1/2MS+Kn (0.1 mg/l)	30	21 (70)	0.9	0.6-0.9	3 (10)	9 (30)
Encapsulated with ½MS+Kn (0.1mg/l)	½ MS + BAP (0.1 mg/l)	20	17	0.9	0.6-0.6	5 (25)	2 (10)
	1/2MS+ Kn (0.5mg/l)	30	23 (76.6)	0.8	0.7-1.1	6 (20)	8 (26.7)
	Potted vermiculite	25	0	0	0	0	0

REFERENCES

Fujii J, Slade D & Redenbaugh K (1989) Maturation and green house planting of alfalfa synthetic seeds. *In-vitro* Cell Develop Biol. 25: 1179-1182.

Kamada H (1985) Synthetic seeds. In: Tanaka R (ed) Practical technology on the mass production of clonal plants. p. 48 CMC Publ, Tokyo.

Kitto S & Janick J (1985) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot . Am. Soc. Hort. Sci. 110: 277-282.

Mathur J, Ahuja PS, Nandalal & Mathur AK (1989) Propagation of *Valeriana* .
Wallichi DC. using encapsulated apical and axial shoot buds. Plant Science 60: 111-116.

Muniswamy B & Sreenath HL (1997) Genotype specificity of direct somatic embryogenesis from cultured zygotic embryos in coffee. In: GA Ravishanker & LV Venkataraman (eds) Recent Advances in Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell Culture. pp 204 - 209. Oxford & IBH publishing Co Pvt. New Delhi.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol Plant 15: 473-497.

Rao PS, Suprasanna P, Ganapathi TR & Bapat VA (1998) Synthetic Seeds:Concept, Methods and Applications. In:PS Srivastava (ed). Plant Tissue Culture and Molecular Biology. pp. 607-619. Narosa Publishing House, New Delhi.

Redenbaugh K, Viss P, Slade D & Fujii JA (1987) Scale-up: artificial seeds . Plant
Tissue and Cell Culture. pp. 473-493. Alan R. Liss Inc, New York .

Redenbaugh K, Fujii JA & Slade D (1988) Encapsulated Plant Embryos. In: Mizrahi A (ed).Biotechnology in Agriculture. pp 225-248 AR Liss, New York.

Redenbaugh K, Fujii JA & Slade D (1993) Hydrated coating for synthetic seeds. In:Redenbaugh K (ed) Synseeds: Applications of

Synthetic Seeds to Crop Improvement. pp.35-46. CRC Press. Inc. Boca Raton Fl. USA.

Sanada M, Sakamoto Y, Hayashi M, Mashiko T, Okamoto A & Ohnishi N (1993). Celery and Lettuce. In: Redenbaugh K (ed) Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. pp 305-327. CRC Press, Boca Raton, USA.

Söndahl MR & Loh WHT (1988). Coffee Biotechnology. In: Clarke, R.L. and Macrae, R (eds). Coffee vol.4, Agronomy. pp. 235-262. Elsevier Applied Science, London.

Sreenath HL & Naidu R (1997) Coffee Biotechnology –review. In: GA Ravishankar & LV Ventakaraman (eds) Recent Advance in Biotechnological: Applications of Plant Tissue and Cell Culture. pp. 14-27. Oxford IBH publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

DESARROLLO DE LA VARIEDAD PORTA-INJERTOS "NEMAYA" (*C. canephora*) POR MEDIO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CENTROAMERICA.

F. Anzueto[1], A. Molina [1], P. Figueroa [1], H. Etienne[2], B. Bertrand[3]

[1]Depto. de Investigaciones, ANACAFE, Guatemala – franciscoA@anacafe.org
[2]CIRAD-CATIE, Costa Rica – hetienne@catie.ac.cr
[3]CIRAD – ICAFE, Costa Rica – bbertrand@catie.ac.cr

1. INTRODUCCIÓN

Los nemátodos constituyen uno de los principales problemas parasitarios del cafeto en América Central. Se reportan básicamente los géneros *Meloidogyne spp.* y *Pratylenchus spp.* Los *Meloidogyne* estan representados por varias especies, con diferentes niveles de agresividad. En Guatemala y El Salvador predominan especies particularmente "agresivas", mientras que en Costa Rica y Honduras, está más difundida *Meloidogyne exigua*, de menor agresividad en campo (12).

Trabajos realizados en Centroamérica hace cuarenta años, dieron indicios sobre la tolerancia y/o resistencia del café "Robusta" a los nemátodos. Esto propició que en Guatemala se desarrollara el injerto hipocotiledonar denominado "Reyna", en referencia a su autor (15). La técnica se practica a escala comercial con buenos resultados, a pesar que se ha trabajado con Robustas de polinización libre, sin selección. Esto podría explicarse por la circustancia que *Pratylenchus* es el nemátodo predominante en ese país. Al respecto, algunas investigaciones confirman que los "Robustas", en general, presentan un buen nivel de tolerancia a este nemátodo (1,4).

En investigaciones preliminares se observó que muchas descendencias de "Robusta" eran resistentes a poblaciones de *Meloidogyne exigua* y *Meloidogyne incognita* de Costa Rica (13, 7, 6), sin embargo, las evaluaciones efectuadas con *Meloidogyne sp.* de Guatemala (fenotipo "F") mostraron altos porcentajes de plantas susceptibles, de 50 a 80 por ciento, en descendencias de Robusta de polinización libre provenientes del CATIE, Costa Rica. En estos estudios también se observó que la descendencia de la planta T3751(1-2), de la misma colección, presentaba un alto nivel de resistencia a Meloidogyne sp. (1).

La evaluación de un plan de cruzamientos controlados entre genotipos de Robusta (6), para la resistencia al nemátodo *Meloidogyne arenaria* de El Salvador (14), mostró igualmente el valor de los genotipos T3751 (1-2) y T3561 (2-1) como padres destacados. La mejor combinación se obtuvo del cruce entre ellos, con un porcentaje de plantas resistentes cercano al 80 por ciento, que sería lo esperado para *Meloidogyne spp.* en Guatemala y El Salvador, y aproximadamente 100 por ciento de resistencia para los *Meloidogynes* de Costa Rica, Honduras y Nicaragua.

Es importante señalar que en una mezcla de varias descendencias libres -que podría ser el caso de Robustas no seleccionados- se presentan alrededor de 35 por ciento de plantas resistentes a los *Meloidogynes* de Guatemala y El Salvador, o sea que habría una ganancia de 45 por ciento por el trabajo de selección. En pruebas realizadas con *Pratylenchus* también destacaron los genotipos T 3751(1-2) y T3561(2-1) con buen nivel de tolerancia a este nemátodo (1, 4).Luego de la selección de los genotipos T3561(2-1) y T3751(1-2), el objetivo era su multiplicación vía vegetativa, considerando la naturaleza de alogamia estricta de *C. canephora*, y luego establecer campos o jardines biclonales, para la producción de semilla híbrida de polinización controlada, destinada a los programas de injertación de los caficultores centroamericanos. A esta variedad portainjertos se le denominó Nemaya, por acuerdo de los investigadores asociados al proyecto (2).La estrategia y desarrollo de las actividades se realizaron en el marco de la cooperación técnica entre PROMECAFE, CIRAD y CATIE. Para la multiplicación de las plantas madres se tomó la decisión de utilizar el método de embriogénesis somática *in vitro*. Esta técnica es conocida desde hace varios años, con diversas aplicaciones en el cafeto (8, 11, 16, 17), la misma consiste en tomar partes somáticas de la planta -secciones de hoja generalmente-, que son introducidos *in vitro* para la formación de callos embriogénicos y posteriormente embriones y plántulas.

El proceso *in vitro* total dura aproximadamente 12 meses en laboratorio. La etapa siguiente incluye el enraizamiento y aclimatación de las plantas fuera del laboratorio (*ex vitro*). Esto se realiza en unidades de aclimatación, sembrando las plantitas en bolsas con substrato o en camas de arena, y adaptándolas progresivamente desde humedad relativa saturante (100%) hacia valores más bajos de humedad. Después de tres meses, las plantas pueden transferirse al vivero, donde pasan 6 o 7 meses antes de plantarse en campo. La multiplicación de callos embriogénicos se realizó en el laboratorio de Biotecnología del CATIE (Costa Rica) y laboratorio de Cultivo de Tejidos

de ANACAFE (Guatemala). Las plantas se aclimataron en Guatemala, dentro de estructuras especialmente construidas para este fin.

2.MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Multiplicación de los padres por embriogénesis somática

Para la multiplicación de los padres T3751 y T3561 se siguió el protocolo sugerido por Etienne y Berthouly (9, 11), con el siguiente proceso:

Para la introducción de los materiales, se toman hojas jóvenes en buen estado, sin lesiones. Las hojas se lavan con agua de chorro, luego se desinfectan sumergiéndolas en solución de benlate 1g/l por 5 minutos, posteriormente se colocan en solución de hipoclorito de calcio al 10 % por 20 minutos, luego se realizan 3 lavados con agua estéril. Las hojas quedan preparadas y se cortan cuadros de 1 cm^2, que se colocan en el medio de cultivo de inducción de callo. Esta etapa se desarrolla en la obscuridad por 4 semanas, en un medio de cultivo constituido por las sales minerales de Murashige et. al., (1962) diluidas 50%, suplementado con: tiamina 10 mg, mio-inositol 100 mg, ácido nicotínico 1 mg, pirydoxina 1 mg, glicina 1 mg, caseína hidrolizada 100 mg, extracto de malta 400 mg, sacarosa 30g, AIB 1 mg, 2 ip 2 mg, pH 5.6, Fitagel 2.5 g.

Luego de 4 semanas el explante pasa a la etapa de expresión de callo. Dicha etapa se desarrolla en luz indirecta durante 6 o 7 meses, en un medio constituido por las sales minerales de Murashige, et. al., (1962) diluidas 50%, suplementado con: mio-inositol 200 mg, tiamina 20 mg, caseína hidrolizada 200 mg, extracto de malta 800 mg, cisteína 40 mg, sulfato de adenina 60 mg, glicina 20 mg, sacarosa 30g, 2,4 D 1 mg, BAP 4 mg, pH 5.6, Fitagel 2.5 g.

Despues de 6 meses en el medio de expresión de callo, la masa callosa pasa a la etapa de regeneración, esta etapa se desarrolla en luz directa en fotoperíodo de 12 horas luz (2000 lux), 12 obscuridad, por 8 semanas, en medio de cultivo constituido por las sales minerales de Murashige et. al. (1962) diluidas 50%, suplementado con: Cisteína 10 mg, tiamina 10 mg, ácido nicotínico 1 mg, glicina 1 mg, ácido nicotínico 1 mg, Mio-inositol 200 mg, caseína hidrolizada 400 mg, extracto de malta 400 mg, adenina 40 mg, BAP 1 mg, sacarosa 40 g, pH 5.6, Fitagel 2.5 g. Luego de 8 semanas, aparecen los embriones somáticos sobre los tejidos que envejecen. Los embriones que se desarrollan, pasan por todas las etapas clásicas de un embrión formado por semilla, o sea, globular, torpedo y cotiledonar.

Germinación de embriones y formación de vitroplantas, ambas etapas se desarrollan en luz directa (2000 lux), en fotoperíodo de 12 horas luz, 12 obscuridad, durante 3 o 4 meses hasta formar vitroplantas aclimatables. Se utiliza un medio de cultivo constituido por las sales minerales de Murashige et al (1962) completas, suplementado con: vitaminas de morel 2 ml, BAP 1 mg, sacarosa 40 g, pH 5.6, Fitagel 2.5 g.

En todas las etapas el medio de cultivo se esteriliza en autoclave, a 120 grados centígrados, a 15 lbs de presión por pulgada cuadrada, durante 20 minutos. La incubación en todas las etapas fue a 29 ± 2 °C y 2000 lux de iluminación en los períodos requeridos.

2.2 Aclimatación de vitroplantas

Es el proceso de acondicionamiento de las vitroplantas, al ambientales externo. Para esta fase se construyó una estructura especial de aclimatación, con un techo de laminas alternando una de zinc y una transparente; bajo este techo se establecieron 4 mini-invernaderos con estructura de tubo PVC de 5 cm, como base para la tela de polietileno transparente. Dentro de cada mini-invernadero se colocó un sistema de nebulización automatizado, que permite la regulación de la humedad relativa (Figura 1).

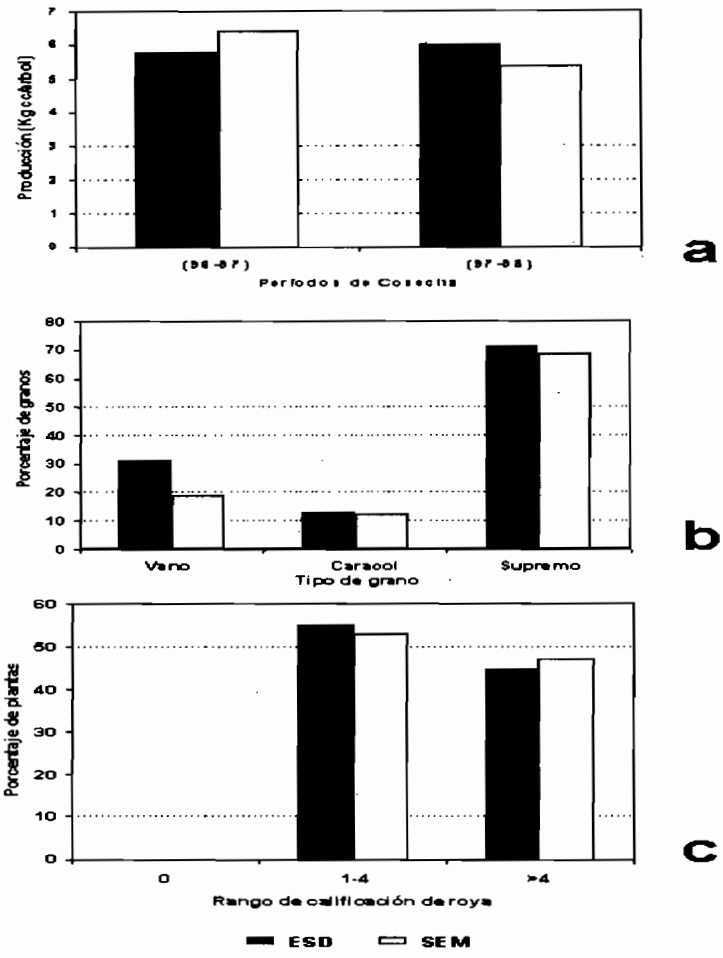


Figura 1. Producción (a), características de grano (b) y resistencia a roya (c) de plantas F1 Caturra x H. de Timor (población A), obtenidas por embriogénesis somática directa (ESD) semilla (SEM).

Para iniciar la aclimatación de las vitroplantas deben tener al menos tres pares de hojas. La preparación al salir de la fase *in vitro* es la siguiente: las raíces formadas in vitro son poco funcionales, por lo cual son cortadas, también se quitan las hojas de la base para dejar un pequeño tallo "limpio", luego se induce el enraizamiento en un medio de cultivo, compuesto por los elementos minerales de Murashige et al (1962) diluidos 50%,
vitaminas de morel 2 ml, tiamina 10 mg, AIB 100 mg, ANA 25 mg, KIN 5 mg, sacarosa 15 g, pH 5.6. En éste medio de cultivo, las plantas permanecen entre 12 y 15 horas a obscuridad. Luego las plantas pasan a los mini-invernaderos, en la unidad de aclimatación, dentro de bolsas con substrato o camas de arena.
Durante la primera semana los mini-invernaderos deben estar completamente cubiertos por la tela de polietileno, bajo nebulización de un minuto por hora, de 7 a.m. a 6 p.m. Luego de una semana se levanta una de las paredes de polietileno (la de menor dimensión), y después de dos semanas se levanta la pared opuesta, y así sucesivamente hasta quitar completamente la tela de polietileno. A partir de este momento, se puede prolongar el intervalo de nebulización, a 1 minuto por hora, o 1 minuto cada dos horas, en el período de 7 a.m. a 6 p.m. En la décima semana de aclimatación, las plantas reciben solamente 3 riegos de un minuto, durante el periodo de 7 a.m. a 6 p.m. En esta edad, las plantas tienen raíz funcional y pueden rasladarse al vivero (10). En todo el ciclo de aclimatación de las plantas, se lleva un estricto control fitosanitario y fertilización foliar, en aplicaciones semanales.

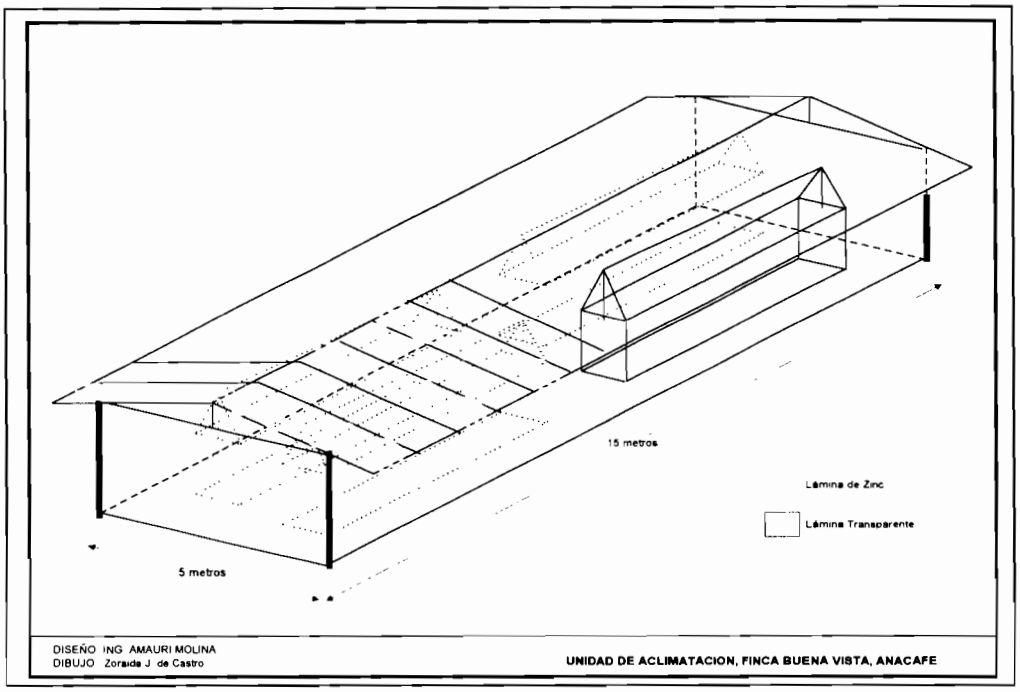


Figura 1. Unidad de Aclimatación con capacidad para 6,000 vitroplantas sobre camas de arena.

2.3 Fase de vivero

Se trabaja en un vivero de tipo convencional, como el utilizado para plantas obtenidas por semilla. Es importante al inicio no exponer las plantas a una radiación solar directa. El vivero es de bambú con techo de palma, que puede regularse fácilmente para dar mayores entradas de luz sobre las plantas. Las plantas aclimatadas se colocaron en bolsas de polietileno negro conteniendo un substrato con 30% de materia orgánica.

En el vivero las plantas pierden rápidamente su condición "micro", desarrollando paulatinamente hojas de tamaño normal. Se continuaron las aplicaciones semanales de fertilizante foliar y fungicidas. Transcurridos dos meses, se efectuó una aplicación de fertilizante de liberación lenta sobre el substrato. Después de 6 o 7 meses en vivero, las plantas se trasladan a campo.

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la reproducción vegetativa de ambos clones de Robusta, la embriogénesis somática demostró ser un método práctico, permitiendo la difusión rápida de estos materiales y su establecimiento en campo. El método convencional que utiliza esquejes o estacas (de brotes ortotrópicos), no era viable para los objetivos del proyecto.

Los clones "padres" de Nemaya, respondieron positivamente al protocolo de desarrollo de embriones somáticos, a pesar de algunos inconveniente por el crecimiento desincronizado de los embriones *in vitro*. Los genotipos presentaron una buena tasa de producción de embriones. Bajo condiciones *in vitro*, el clon T3751 desarrolla más lentamente, y presenta mayor brotación basal que el clon T3561. Esta característica también se observa en campo, por lo que se considera de orden genotípico.

En Guatemala, el método de aclimatación empleado presenta una eficiencia de 90 por ciento, en la relación, plantas de vivero útiles/vitroplantas. Con plantas de vivero bien desarrolladas, se han establecido al momento 2 hectáreas como campo semillerista, de un total de 8 hectáreas programadas para el año 1999. Para esta actividad se cuenta con 15,000 vitroplantas en diferente estado de desarrollo en laboratorio y la unidad de aclimatación. Al iniciarse la producción comercial de semilla híbrida en estos lotes, la variedad portainjertos Nemaya (*C. canephora*) estará disponible para que los caficultores guatemaltecos la utilicen en sus programas de injertación.

4.REFERENCIAS

ANZUETO, F., 1993. Etude de la resistance du cafeier (Coffea spp.) a Meloidogyne spp. y Pratylenchus sp. These doct. Ecole Nationale Superieure de Rennes, France. 123 p.

ANZUETO, F., BERTRAND, B., DUFOUR, M. 1995. "NEMAYA", Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales

nemátodos de América Central. Boletín IICA-PROMECAFE, Guatemala. pp 13-15.

ANZUETO, F., ESKES, A.B., SARAH, J.L., DECAZY, B. 1993. Résistance de quelques descendances de Coffea arabica y C. canephora vis-à-vis de deux populations de Meloidogyne spp., originaires du Guatemala et du Brésil. Association Scientifique International du Cafe, 42, rue Scheffer, 75116 Paris, Francia, ASIC n° 15, pp: 338-349.

ANZUETO, F., VILLAIN, L. & MOLINA, A. 1996. Informe grupo técnico PROMECAFE/ANACAFE, Proyecto Regional de Resistencia a los Nemátodos en Centroamérica PROMECAFE-IICA-CATIE/CIRAD. Guatemala, febrero 1996. 12p.

BERTRAND, B., ANZUETO, F., PEÑA, M., ANTHONY, F., ESKES, A.B. 1995. Genetic Improvemente of Coffee for Resistance to Root-knot Nematodes (Meloidogyne spp.) in Central America. In: ASIC n° 16, Kyoto, Japon. Association Scientifique International du Café, 42, rue Scheffer, 75116 Paris, France.

BERTRAND, B.1994. Informe anual de Actividades de PROMECAFE-CICAFE-CIRAD. CICAFE, Costa Rica.

CALDERON, V.M. 1989. Reacción de diferentes genotipos de café a Meloidogyne arabicida, López y Salazar (1989), gama de hospedantes y hongos fitopatógenos asociados. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 71p.

DUBLIN, P., 1984. Techniques de reproduction végétative in vitro et amelioration genetique chez les caféiers cultivés. Café Cacao Thé, 28 (4): 231-244.

ETIENNE H., BERTHOULY, M. 1997. Comunicación personal, visita de asesoría al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de ANACAFE, Guatemala.

ETIENNE H., SOLANO W., PEREIRA A., BERTRAND B. & BERTHOULY M. 1996. Protocolo de Aclimatación Para Vitroplantas de Café. CATIE, CIRAD, PROMECAFE, CICAFE. Laboratorio de Biotecnología, CATIE, Costa Rica, octubre 1996.

ETIENNE H., SOLANO W., PEREIRA A., BARRY-ETIENNE D., BERTRAND B., ANTHONY F., CÔTE F. & BERTHOULY M. 1997. Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación masal de los híbridos F1 de Coffea arabica. In: Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, Costa Rica 1997, ICAFE, IICA, PROMECAFE. P 253-261.

HERNANDEZ, A. 1997. Étude de la variabilité intra et interspécifique des nématodes du genre Meloidogyne parasites des caféiers en Amérique Centrale. These doct. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, France. 102p.

MORERA, N. 1990. 1986. Evaluación de la interacción entre genotipos de Meloidogyne exigua Goeldi (1887) y Coffea sp. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 59p.PEÑA, M.X. 1994. Evaluación fenotípica y genética para la resistencia al nemátodo Meloidogyne incognita en híbridos de Coffea canephora. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 78p.

REYNA, E.H. 1966. Un nuevo método de injertación en café. Boletín técnico # 21. Dirección General de Investigación y Control Agropecuario, Ministerio de Agricultura, Guatemala. 21 p.

SONDAHL M., SHARP W.R., 1977. High frequency induction of somatic embryios in cultured leaf explants of Coffea arabica L. Z. Pflazenphysiol. Bd., S. 81: 395-408.

ZAMARRIPA A., DUCOS J.P., TESSEREAU H., BOLLON H., ESKES, A.B. & PETIARD V. 1991. Mass propagation of coffea spp by somatic embryogenesis in liquid medium. In: 14th International Scientific colloquium on coffee. San Francisco, E.U. 14-19 July 1991. P. 392-402.

FUSÃO INTERESPECÍFICA DE PROTOPLASTOS EM *Coffea*

Cordeiro, AT[1]; Zambolim, L[2]; Pétiard, V[3] Spiral, J[3]

[1]DBV/UFV, [2]DFP/UFV: Av. P.H. Rolfs, s/n – 36.571.000 – Viçosa-MG/Brasil)
[3]CRN – 101, Av. Gustave Eiffel, 37.390 – Notre Dame d'Oé, France)

ABSTRACT

Introgression of nematode resistance from Coffea canephora cv. Apoatã was attempted in diploid (DH_3) and tetraploid (Catimor and Catuaí Amarelo) C. arabica genotypes by protoplast fusion to evaluate the feasibility of interspecific protoplast fusion as a tool in the parassexual improvement in Coffea. Protoplasts were isolated from embryogenic cell suspensions initiated from leaf explants-derived friable embryogenic calli. The kinętics of growth and protoplast yield of Apoatã and DH_3 cell suspensions was evaluated at different intervals of subcultures and conditions of enzymatic digestion of the cell wall of their small cell aggregates. Investigations concerning selection of protoplast heterofused-derived cell aggregates were also accomplished. Immediately to the subculture, Apoatã and DH_3 cell suspensions showed a typical sigmoidal growth curve. Coincidentally, the lowest protoplast yields were observed for post-subculture intervals above the inflection point. High protoplast yields were achieved when the two pectinases were combined to cellulase, at the highest tested concentrations. The twelve protoplast culture media tested did not allow any distinction between parental protoplasts Apoatã and DH_3, at microcalli growth stages. Alternatively, the metabolic inhibitors iodoacetamide and rhodamine, at the concentrations 2 and 0.9 mM, respectively, were effective in inhibiting microcalli formation from cultured parental protoplasts. The inhibitors allowed the accomplishment of 23 independent interspecific electrofusion assessments, whose products led to the development of embryogenic differentiation. Further work will be carried out in order to characterize the putative heterofused regenerants and to examine the potential of somatic hybridization as a tool for parassexual improvement in Coffea.

INTRODUÇÃO

Na cafeicultura, elevadas produtividades com reduzidos custos de produção e preservação ambiental requerem material genético que expresse, além da alta capacidade de produção de frutos com maturação uniforme, resistências às pragas e doenças. As suas inexistências na espécie *Coffea arabica* têm estimulado a pesquisa no sentido das suas transferências, a partir de outras espécies doadoras de *Coffea*, para variedades arábicas. Porem, as instabilidades, genética e cromossômica, e o ciclo de seleção relativamente longo têm retardado estas obtenções, que podem ser antecipadas com a técnica de fusão de protoplastos. Sua utilização entre duas populações distintas de protoplastos produz parentais não fusionados, homofusões e heterofusões, simétricas (Gaikwad et al., 1996) ou assimétricas (Fahleson et al., 1997). Estes últimos produtos, que representam geralmente menos do que 10% da mistura total fusionada (Waara e Glimelius, 1995), devem ser separados de uma população inicial de aproximadamente $5x10^5$ protoplastos. Para tanto, pode-se fusionar protoplastos parentais metabolicamente inativados, cada um com um inibidor de ação distinta do outro (Böttcher et al., 1989), permitindo a seleção por complementação metabólica que libera apenas os heterofusionados do impedimento ao desenvolvimento.

MATERIAIS e MÉTODOS

Os protoplastos foram obtidos mediante digestão enzimática de agregados celulares de culturas líquidas embriogênicas de genótipos canéfora e arábicas. O genótipo canéfora foi o cultivar Apoatã IAC LC 2258, resistente à *Meloidogyne exigua* (Fazuoli, 1986) e às raças 2 (Mazzafera et al., 1989) e 3 (Lima et al., 1989) de *M. incognita*. Os arábicas testados foram o diplóide partenogenético DH_3 e os tetraplóides Catimor e Catuaí Amarelo. À exceção de quando se estudou o rendimento protoplástico (R_p) em resposta ao tempo de digestão e à concentração das enzimas celulase e pectinases, utilizou-se sempre a solução enzimática para obtenção de protoplastos (SEOP) citada por Spiral e Pétiard (1991). A pressão osmótica desta solução, bem como de todas aquelas utilizadas com protoplastos, foi fixada em -1,537 MPa (Söndahl et al., 1980), ao permitir-se variar apenas a concentração de manitol. Os inibidores metabólicos, rodamina e iodoacetamida, eram adicionados antes dos 30 min finais da digestão. Uma vez purificados, os protoplastos expostos ou não à eletrofusão em câmara de fusão constituida de um sistema multieletrodo (Sihachakr et al.,1988), eram

cultivados em meio de cultura com agarose (Cordeiro, 1999). Os tratamentos foram avaliados mediante contagem, parcial ou total, dos protoplastos ou dos microcalos regenerados dos protoplastos plaqueados.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Estudou-se a cinética do crescimento de culturas líquidas dos genótipos arábica diplóide DH_3 e canéfora Apoatã com vistas à identificação do tempo pós-subcultura no qual a maioria dos agregados celulares encontrar-se-ia em divisão celular. Ambos os genótipos, Apoatã e DH_3, revelaram, imediatamente à subcultura, uma fase exponencial de crescimento celular até um ponto de inflexão (t_i), a partir do qual as taxas de crescimento reduziram-se progressivamente para um peso da matéria fresca de agregados celulares assintótico (Fig. 1A). A fase inicial exponencial, neste trabalho, parece sugerir que, imediatamente à subcultura, apenas uma fração das células participa do crescimento da suspensão celular em concordância com as observações de Vasil e Vasil (1986). Além do ponto de inflexão, algum fator, provavelmente um componente integrante do meio líquido ou liberado para este pelas células em cultivo, começou a limitar o crescimento das culturas celulares. Coincidentemente, menores redimentos protoplásticos (R_p's) a partir de suspensões celulares dos dois genótipos foram também observados para tempos pós-subcultura superiores ao t_i (Fig. 1B). Rendimentos da ordem de 10^5 (Acuña e Pena, 1991; Söndahl et al., 1980) e de 10^7 (Tahara et al., 1994) têm sido relatados.

Foram realizados 96 ensaios de eletrofusão interespecífica envolvendo os genótipos parentais Apoatã com os arábicas parentais diplóide DH_3 e tetraplóides Catuaí Amarelo e Catimor (Tab. 1). Dentre estes, 42 (44% de 96) foram causa de insucesso, em razão da concentração inadequada de rodamina no controle do desenvolvimento de protoplastos parentais, principalmente DH_3 e Apoatã, e 23 (24% de 96) causa de sucesso, atribuível em grande parte à sensibilidade diferencial dos arábicas face à ação inibitória de rodamina

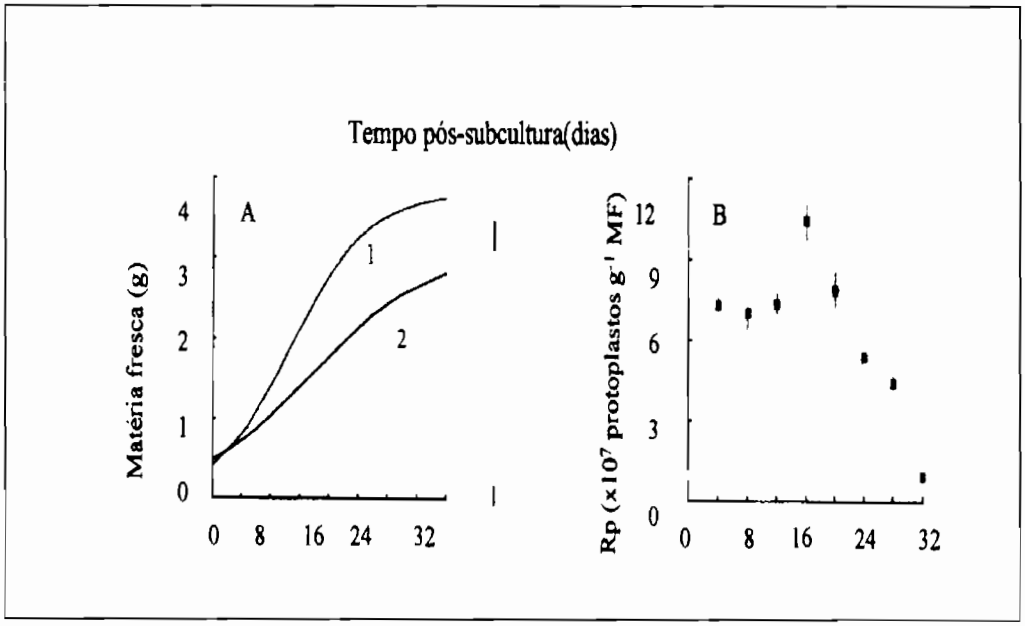


Figura 1-Acúmulo de matéria fresca de agregados celulares (A) DH_3 (1)e Apoatã (2) e Rp (B) de agregados celulares Apoatã em função do tempo pós-subcultura. Os agregados celulares foram cultivados meio líquido na densidade inicial de $10gL^{-1}$. As equações das curvas de matéria fresca (MF) f(tempo) para DH_3 e Apoatã são respectivamente: $MF=3806,58/(1+7,9789e^{-0,1903t})$ $R^2=0,994$ e $MF=3098,83/(1+5,3780e^{-0,1227t})$ $R^2=0,995$. As barras indicam o erro padrão da média de três repetições.

Tabela 1 - Caracterização numérica dos ensaios de eletrofusão envolvendo diferentes combinações parentais relativamente aos sucessos e insucessos e suas causas: contaminação, concentração inadequada do inibidor metabólico rodamina (CIMR) e má qualidade dos protoplastos (MQP).

Genótipos parentais	Sucesso	Insucesso		
		Contaminação	CIMR	MQP
Apoatã + diplóide DH$_1$	6	14	31	1
Apoatã + Catuaí Amarelo	6	2	5	12
Apoatã + Catimor	11	2	6	-
Total	23	18	42	13

Assim, a maior sensibilidade dos arábicas tetraplóides à esse inibidor metabólico significou os maiores percentuais de sucesso dentre as três combinações parentais testadas. As concentrações adequadas dos inibidores no controle do desenvolvimento de protoplastos, principalmente no que se refere à rodamina, somente puderam ser conhecidas no período final da parte experimental quando já não havia mais tempo hábil para a realização de novas eletrofusões. Somente o seu conhecimento seria suficiente para elevar a freqüência de ensaios com sucesso no controle eficiente do desenvolvimento de protoplastos parentais e daqueles provenientes de homofusões de 23 (24%) à 65 (~ 70%).

Os resultados de quatro dos 23 ensaios que se destacaram pelo aparente sucesso no controle do desenvolvimento de protoplastos parentais e daqueles provenientes de homofusões encontram-se na Figura 2. Sua eficiência e a inferioridade numérica dos microcalos regenerantes de protoplastos parentais tratados com os inibidores metabólicos, relativamente aos microcalos regenerantes dos mesmos protoplastos eletrofundidos, sugerem que esta diferença em microcalos é decorrente da fusão interespecífica de protoplastos, que se desenvolveram graças à complementação metabólica.

No momento, os calos regenerantes vivos que não expressaram, ainda, a sua capacidade embriogênica vêm sendo repicados com vistas àquela diferenciação. Os embriões produzidos vêm sendo transferidos, sequencialmente, para os meios M4 e M5, utilizados por Zamarripa et al. (1991), objetivando-se a regeneração de plantas. Essas plantas permitirão caracterizar a eficiência do método de seleção utilizado, bem como o potencial da fusão protoplástica para a produção de híbridos somáticos em *Coffea*.

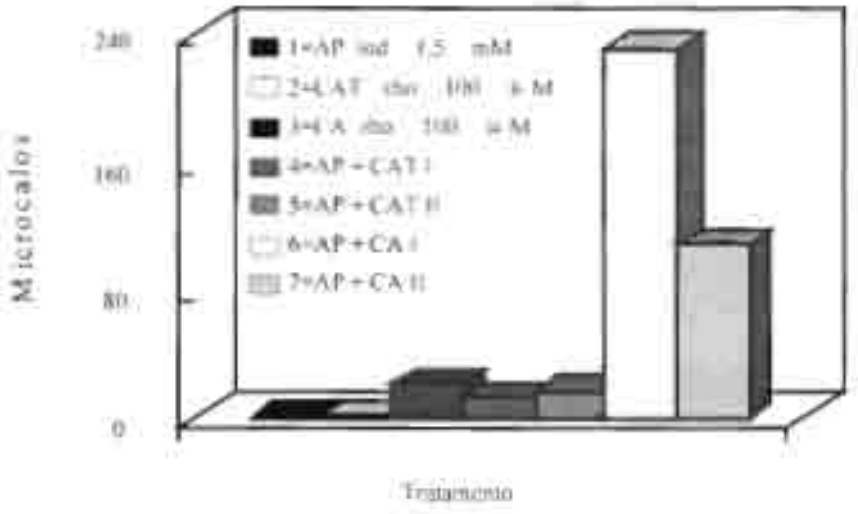


Figura 2 - Microcalos regenerados de protoplastos parentais dos genótipos *C. canephora* cv. Apoatã (AP) e *C. arabica* cv.'s Catimor (CAT) e Catuaí Amarelo (CA) tratados com os inibidores metabólicos rodamina (rho) e iodoacetamida (iod) seguidos (+) ou não de eletrofusão. Os microcalos foram contados após dois meses e meio de cultivo com auxílio de microscópio luminoso.

REFERÊNCIAS

Acuña R & De Pena M 1991. **Plant Cell Rep.**, 10:345-348.

Böttcher U; Aviv D; Galun E 1989. **Plant Sci.**, 63:67-77.

Cordeiro, AT 1999. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa. 1999.

Fahleson J; Langercrantz V; Mouras A; Glimelius K 1997. **Plant Sci.**, 123:133-142.

Fasuoli LC 1986. In: A.B. Rena *et al.* (eds), **Cultura do Cafeeiro – fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP. Associação Brasileira Pesq. Potassa Fosfato. p. 87-113.

Gaikwad K; Kirti PB; Sharma A; Prakash S; Chopra VL 1996. **Plant Breeding**, 115:480-483.

Gamborg OL; Miller RA; Ojima K 1968. **Exp. Cell Res.**, 50:151-158.

Lima MMA; Gonçalves W; Fazuoli LC; Tristão RO 1989. In: **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, 15, Maringá, 1989. Resumos. Rio de Janeiro, COTEC/DIPRO/IBC. p. 128-129.

Mazzafera P; Gonçalves W; Fernandes JAR 1989. In: **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, 15, Maringá, 1989. Resumos. Rio de Janeiro, COTEC/DIPRO/IBC. p. 128-129.

Morel G & Wetmore RH 1951. **Am. J. Bot.**, 38:141-143.

Ohgawara J; Kobayashi S; Ohgawara E; Uchimiya H; Ishii S 1985. **Theor. Appl. Genet.**, 71:1-4.

Power JB; Berry SF; Freason EM; Cocking EC 1977. **Plant Sci. Lett.**, 10:1-6.

Sidorov VA; Menczel L; Nagy F; Maliga P 1981. **Planta**, 152:341-345.

Sihachakr D; Haicour R; Serraf I; Barrientos E; Herbreteau C; Ducreux G; Rossignol L; Souvannavong V 1988. **Plant Sci.**, 57:215-223.

Söndahl MR; Chapman MS; Sharp WR 1980. **Turrialba**, 30:161-165.

Spiral J & Pétiard V 1991. In: **Colloque Scientifique International sur le Café**, 14, San Francisco, 1991. ASIC (Paris). p.383-390.

Tahara M; Yasuda T; Uchida N; Yamaguchi T 1994.. **Hortscience**, 29:172-174.

Vardi A; Frydman-Shani A; Galun W; Gonen P; Bliechman S 1990. **Acta Hort.**, 280:239-245.

Vasil V & Vasil IK 1986. **J. Plant Physiol.**, 124:399-408.

Waara S & Glimelius K 1995. **Euphytica**, 85:217-233.

Yasuda T; Fujii Y; Yamaguchi T 1985. **Plant Cell Physiol.**, 26:595-597.

GOVERNO DO PARANÁ
Secretaria da Agricultura e do Abastecimento

IAPAR
Instituto Agronômico do Paraná

PROGRAMA CAFÉ

- Alaide Ap. Krzyzanowsk , Nematologia
- Alex Carneiro Leal, Agrossilvicultura
- Amador Villacorta M., Entomologia
- Ana Maria Meneguim, Entomologia
- Arnaldo Colozzi Filho, Microbiologia de solos
- Armando Androciolo Filho, Fitotecnia
- Carlos Armênio Khatounian, Fitotecnia
- Carlos Augusto P. Motta, Propagação vegetal
- Carlos Roberto Riede, Genética
- Celso Jamil Marur, Ecofisiologia
- Dimas Soares Jr., Sócio -economia
- Edmilson G. Liberal, Difusão deTecnologia
- Elcio C. Balota, Microbiologia de solos
- Jomar da Paes Pereira, Fitotecnia
- Júlio C. D. Chaves, Manejo de solos e nutrição
- Luiz Felipe P. Pereira, Biotecnologia
- Luiz Gonzaga E. Vieira, Biotecnologia
- Marcos A . Pavan, Solos e nutrição
- Marcos Valentin, Difusão de tecnologia
- Maria B. Scholz, Bioquímica / Tec. de alimentos
- Maria C. L. Dias, Propagação vegetal
- Maria Lúcia Crochemore, Biotecnologia
- Mário Miyazawa, Química de solos
- Nelson Fonseca Jr., Genética
- Paulo H. Caramori, Agrometeorologia
- Rodolfo Bianco, Entomologia
- Rogério M. L. Cardoso, Fitopatologia
- Rogério Teixeira Farias, Engenharia agrícola
- Rubens Siqueira, Engenharia agrícola
- Rui Gomes Carneiro, Nematologia
- Rui Pereira Leite, Fitopatologia
- Sonia M. Torrecillas, Entomologia
- Tumoru Sera, Genética

MARCADORES DE DNA PARA MELHORAMENTO DO CAFEEIRO

Ney S. Sakiyama

Universidade Federal de Viçosa Departamento de Fitotecnia 36571-000 Viçosa, MG

INTRODUÇÃO

A cafeicultura mundial tem sido grandemente beneficiada pelo sucesso dos programas de melhoramento genético, que têm colocado à disposição do agricultor cultivares produtivas e adaptadas a condições específicas de cultivo. No Brasil, por exemplo, as cultivares melhoradas de café arábica (*Coffea arabica* L.) produzem três a quatro vezes mais que as cultivares utilizadas no passado. Entretanto, tal sucesso elevou a produtividade dessa espécie a um platô aparentemente difícil de ser superado. Tome-se, como exemplo, as produtividades das linhagens melhoradas de 'Mundo Novo', 'Catuaí Vermelho' e 'Catuaí Amarelo', até hoje as mais produtivas. Um dos grandes desafios para os melhoristas é, portanto, **superar as produtividades** das cultivares atuais.

Em virtude da susceptibilidade da espécie arábica a várias doenças e pragas, outro grande desafio para os melhoristas é a **transferência de genes** de resistência e tolerância. Apesar de *C. arabica* possuir o dobro do número de cromossomos das demais espécies do gênero, algumas hibridações interespecíficas têm sido exploradas com sucesso pelos pesquisadores objetivando essas introgressões. A ocorrência mundial da ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.), por exemplo, e os prejuízos por ela causados, despertaram o interesse dos melhoristas na busca de cultivares de café arábica resistentes, por meio de hibridação natural ou artificial com *Coffea canephora* Pierre.

Em café, como em outras plantas, o melhoramento por hibridação pressupõe a identificação da variabilidade genética quanto às características a serem melhoradas, a escolha das hibridações mais promissoras, e a aplicação de métodos que favoreçam a seleção de híbridos, ou linhagens, ou populações superiores. Nesse contexto, tecnologias de **marcadores de DNA** têm sido propostas como instrumentos úteis aos programas de pesquisa. Especialmente em café, por tratar-se de uma cultura perene e de período juvenil longo, essas tecnologias podem beneficiar o melhoramento genético de forma potencialmente grande.

MARCADORES DE DNA

O termo marcador genético é usado para identificar qualquer fator morfológico, fisiológico ou molecular que possibilite a diferenciação entre dois genótipos e que seja herdável por reprodução sexuada. De modo geral, os marcadores genéticos são expressões fenotípicas das diferenças genéticas existentes entre dois indivíduos. Entre os marcadores moleculares, entretanto, há uma classe denominada **marcadores de DNA**, que resultam da manipulação direta das moléculas de DNA.

Foram desenvolvidas várias tecnologias de marcadores de DNA, todas baseadas em **polimorfismos de DNA** existentes entre genótipos. Dependendo da tecnologia utilizada, o polimorfismo entre genótipos, em um dado *locus*, pode ocorrer de duas formas mais comuns: na forma de presença de fragmentos de DNA em um indivíduo e ausência no outro, ou na forma de fragmentos de comprimentos diferentes para os dois indivíduos. Tais fragmentos são separados por eletroforese e visualizados na forma de **bandas**, por meio de técnicas de coloração ou de hibridação com sondas marcadas. Ao conjunto de bandas dá-se o nome de **padrão eletroforético**.

Os marcadores de DNA podem ser qualificados, quanto ao tipo de herança, como marcadores dominantes ou marcadores codominantes (Figura 1 e 2). **Marcadores dominantes** são aqueles que não possibilitam diferenciar um indivíduo heterozigoto de um indivíduo homozigoto para o alelo dominante, em um dado *locus* em estudo. É o que geralmente ocorre com os marcadores cujos polimorfismos se baseiam na presença (alelo dominante) ou ausência (alelo recessivo) do fragmento de DNA. Os marcadores dominantes são visualizados, então, na forma de presença ou ausência de bandas. Com esse tipo de marcador, uma população F_2 oriunda de autofecundação de indivíduo F_1 diplóide heterozigoto apresenta segregação na proporção de 3:1 (3 indivíduos com a banda presente : 1 indivíduo com banda ausente). **Marcadores codominantes** são aqueles que permitem identificar um indivíduo heterozigoto de qualquer indivíduo homozigoto para o *locus* em estudo. É o que geralmente ocorre com os marcadores cujos polimorfismos se baseiam na

diferença de comprimento de fragmentos de DNA. Os marcadores codominantes são visualizados, então, na forma de bandas em posições diferentes; cada banda correspondendo a um alelo alternativo. Com esse marcador, uma população F_2 oriunda de autofecundação de indivíduo F_1 diplóide heterozigoto apresenta segregação na proporção de 1:2:1 (1 indivíduo com somente a primeira banda presente : 2 indivíduos com ambas as bandas presentes : 1 indivíduo com somente a segunda banda presente). Excepcionalmente, um marcador tipicamente dominante torna-se codominante, quando o heterozigoto é identificável por meio da quantificação do DNA presente na banda.

Os marcadores de DNA se destacam pelo elevado número em que podem ser obtidos, por apresentarem herança simples e por apresentarem resultados consistentes, independentemente das condições de ambiente de cultivo da planta ou do tipo ou idade do tecido amostrado. Essas características são ainda mais relevantes para a pesquisa com café, uma cultura perene com período juvenil longo. As avaliações com marcadores de DNA podem, por exemplo, ser realizadas em estádios iniciais de desenvolvimento da planta, ou até mesmo na semente, apresentando resultados idênticos aos que seriam obtidos na fase adulta. Os genótipos de café estudados freqüentemente têm idades diferentes ou estão localizados em ambientes distintos e, mesmo assim, os resultados desses marcadores podem ser comparados. Eles têm sido utilizados em café para o estudo de padrão molecular (DNA *fingerprint*) e ligação gênica (*linkage*).

Genitor 1	**Genitor 2**	**Híbrido**	
I		I	Banda A Polimórfica
I	I	I	Banda B Monomórfica

Figura 1: Representação de padrão eletroforético de um marcador dominante; o híbrido é igual ao genitor 1 e diferente do genitor 2.

Genitor 1	Genitor 2	Híbrido	
I		I	Banda A Polimórfica
	I	I	Banda B Polimórfica

Figura 2: Representação de padrão eletroforético de um marcador codominante; o híbrido é diferente dos dois genitores.

Entre os exemplos de marcadores de DNA, podem ser citados: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), STR (*Short Tandem Repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), etc.

PADRÃO MOLECULAR (DNA *FINGERPRINT*)

Caracterização de padrão molecular (DNA *fingerprinting*) é a identificação do genótipo por meio de marcadores de DNA. Os padrões moleculares permitem identificar diferenças e similaridades entre indivíduos ao nível de DNA.

O uso de padrões moleculares tem sido freqüente nos estudos de diversidade genética das espécies presentes em bancos de germoplasma e na natureza. Essas informações adicionais sobre a diversidade genética facilitam a identificação de novos variantes na natureza a serem introduzidos nos bancos de germoplasma, ou de duplicações a serem eliminadas. Orientam, também, a formação de subamostras do germoplasma, as chamadas coleções básicas (*core collections*), as quais devem representar, com o mínimo de redundância, o máximo possível de diversidade presente numa coleção completa. Coleções básicas podem ser mais facilmente transferidas aos diversos centros de pesquisa para atender as necessidades dos melhoristas. A manutenção de diferentes coleções básicas, em diversas localidades, representa também uma estratégia eficaz e econômica de preservação da diversidade genética. Em café, os marcadores de DNA têm sido utilizados para estudos sobre a origem e diversidade genética (Lashermes et al., 1999; 1993; Orozco-Castillo et al., 1996; 1994; Teixeira et al., 1999a; 1999b). A Figura 3 exemplifica os padrões eletroforéticos obtidos com marcadores RAPD em café.

Padrões moleculares podem ser utilizados como descritores genéticos, para fins de identificação de cultivares. As limitações dos marcadores morfológicos utilizados para descrever as cultivares, de forma a dar-lhes a distingüibilidade prevista na Lei de Proteção de Cultivares (Lei 9.456, de 25 de abril de 1997), podem ser diminuídas pela inclusão de marcadores de DNA. Em café, marcadores RAPD foram utilizados para estimar as distâncias genéticas entre 16 linhagens comerciais de *C. arabica* e, apesar da pequena variabilidade total, verificaram-se locos

polimórficos mesmo entre linhagens bastante aparentadas (Teixeira et al., 1999).

A possibilidade do emprego de dados de divergência genética avaliada por marcadores de DNA para predizer a performance de híbridos F_1 tem sido investigada. Essa divergência pode ter valor preditivo especialmente quando medida entre linhagens melhoradas. Quando se utilizam marcadores tomados ao acaso, nem sempre a divergência máxima observada para um par de genótipos corresponde ao valor máximo de heterobeltiose no F_1 por eles gerado. A predição, portanto, torna-se mais confiável se os marcadores utilizados estiverem associados às características que se desejam melhorar no híbrido e estiverem presentes de forma complementar no par de genitores.

Os padrões moleculares podem ser utilizados na seleção assistida em retrocruzamentos visando a recuperação mais eficiente do genótipo recorrente. A introgressão de genes de interesse, como os que condicionam resistência a doenças e pragas, é freqüentemente realizada pelo uso do método de retrocruzamentos. Nesse método, a recuperação do genétipo recorrente ocorre de forma gradual, sendo necessárias várias gerações de retrocruzamento. A seleção de indivíduos fenotipicamente mais semelhantes ao genitor recorrente, associada à seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Selection*-MAS), pode reduzir o número de retrocruzamentos necessários para atingir o mesmo grau de recuperação desse genótipo. Se o mapa molecular é disponível, recomenda-se a escolha de marcadores uniformemente distribuídos ao longo do genoma. Quando se usam marcadores dominantes para esse fim, devem-se selecionar marcadores cujas bandas sejam presentes no genitor doador e ausentes no recorrente. A cada geração de retrocruzamento, ocorre a fixação de vários alelos do recorrente, que pode ser observada por meio de marcadores.

Outras formas de utilização de padrões moleculares no melhoramento do cafeeiro são possíveis, como por exemplo: avaliação de taxa de fecundação cruzada, confirmação da obtenção de híbridos em cruzamentos artificiais; verificação da pureza genética de linhagens e clones, avaliação de variações somaclonais, etc.

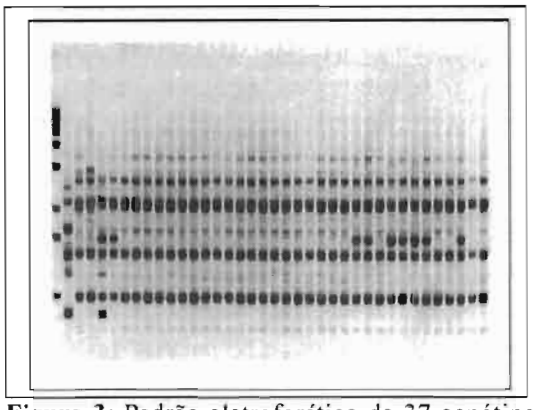


Figura 3: Padrão eletroforético de 37 genótipos de café, obtidos por marcador RAPD.
Foto: T.A.Teixeira.

LIGAÇÃO GÊNICA (*LINKAGE*)

Ligação gênica é o fenômeno ou padrão de transmissão de genes ligados. Genes ligados são aqueles localizados no mesmo cromossomo, os quais tendem a permanecer unidos durante a reprodução sexuada, ou seja, não apresentam segregação independente. Marcadores moleculares podem ser estudados em função da ligação entre si ou entre eles e os genes que controlam as características de interesse.

Três possibilidades de uso da ligação gênica são exploradas no estudo de marcadores moleculares: o mapa molecular, o mapeamento de genes que controlam características qualitativas e o mapeamento de regiões cromossômicas responsáveis por características quantitativas (*Quantitative Trait Loci*-QTL).

Mapa genético é mapa cromossômico, que informa sobre a ordem linear dos genes ao longo de cada cromossomo e sobre as distâncias entre os genes medidas pelas probabilidades de ocorrência de permutas. Os mapas são construídos com o propósito de localizar fisicamente as informações genéticas. Por meio do mapa genético podem-se verificar as relações existentes entre as várias características de interesse agronômico,como por exemplo, a ocorrência de ligação gênica, pleiotropia, segregação independente das características. Até o advento de marcadores moleculares, a construção de mapas genéticos era dificultada pela necessidade de um número considerável de genes de herança simples, com segregação fenotípica visível, e pelo grande número de cruzamentos necessários para mapear cada novo gene em estudo. Para a construção desses mapas utilizavam-se, com freqüência, genes mutantes em cruzamentos envolvendo séries de aneuplóides ou de trissômicos. Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens na construção de mapas genéticos: comportam-se

como fatores mendelianos simples, a segregação alélica independe de segregação fenotípica visível, são estáveis e obtidos em grande número, e podem gerar um mapa utilizando-se uma população segregante oriunda de um único cruzamento. Em café, um mapa molecular foi construído a partir de uma população de di-haplóides de *C. canephora* (Paillard et al., 1996). Os mapas moleculares podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores (MAS), no mapeamento e clonagem de genes simples e no mapeamento de QTLs. O maior impacto da aplicação de mapas moleculares no melhoramento de plantas, sem dúvida, advirá do mapeamento de QTLs associados a características de interesse agronômico.

O mapeamento de genes que controlam **características qualitativas** de importância agronômica em cafeeiro pode ser útil aos programas de melhoramento pela sua utilização na seleção assistida por marcadores. Esta seleção indireta tem aplicação em programas onde se pretende promover, por exemplo, a piramidação de genes de resistência a doença, a qual é difícil de ser executada pelos métodos convencionais. A seleção indireta simultânea de diferentes características também é possível pela utilização de marcadores. Marcadores de DNA foram identificados para mapeamento da auto-incompatibilidade em *C. canephora* (Lashermes et al., 1996), e da resistência a *Colletotrichum kahawae* (Agwanda, et al., 1997) e a *Hemileia vastatrix* (Tedesco et al., 1999) em *C. arabica*. Nesse último, busca-se o mapeamento de genes com vistas à piramidação de genes dominantes de resistência à ferrugem-do-cafeeiro em linhagens melhoradas.

Característica quantitativa é geralmente referida como aquela que é condicionada por vários genes de efeitos pequenos e semelhantes. O uso de marcadores de DNA, entretanto, têm demonstrado que as características quantitativas podem ser condicionadas por *loci* de efeitos diferentes. Os *loci* de efeitos detectáveis na variação de uma característica quantitativa são chamados **QTLs**. Por meio do mapa molecular, é possível identificar QTLs que explicam partes significativas das variações genéticas de características quantitativas. Uma aplicação imediata do mapeamento de QTLs em programas de melhoramento é a escolha de genitores que apresentem QTLs complementares, os quais apresentarão maiores chances de manifestação de heterobeltiose nos híbridos e de recombinações favoráveis nas gerações segregantes. Marcadores associados a QTLs podem também ser utilizados em programas de retrocruzamentos onde a seleção assistida por marcadores (MAS) é praticada. Uma nova e importante contribuição dos estudos de QTLs se refere à estratégia de avaliação e utilização de germoplasma. Tanksley e McCouch (1997) propõem a "procura dos genes" (novo paradigma) em substituição à "procura do fenótipo" (velho paradigma). A procura do fenótipo de interesse agronômico tem sido a estratégia tradicional de utilização do germoplasma no melhoramento. Agora, o germoplasma pode também ser avaliado diretamente quanto à presença de genes úteis nos acessos, por meio de marcadores associados a QTLs, mesmo que esses *loci* não resultem em diferenças fenotipicamente observáveis.

CONCLUSÃO

Nas palavras do Dr. Alcides Carvalho, "o Brasil já foi um imenso cafezal oriundo de poucas plantas". As introduções de novos genótipos trouxeram significativos progressos ao melhoramento. As hibridações interespecíficas tem sido exploradas no melhoramento, a exemplo das pesquisas visando a obtenção de cultivares resistentes à ferrugem-do-cafeeiro e ao bicho-mineiro. A utilização do germoplasma de café trará importantes benefícios ao melhoramento pela transferência de genes de resistência a doenças e pragas e de QTLs asssociados a essas e outras importantes características agronômicas, como a produtividade. Nesse contexto, os marcadores de DNA deverão ter um papel importante nos programas modernos de melhoramento genético do cafeeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGWANDA, C.O.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M.C.; CHARRIER, A. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. **Euphytica, 97**:241-248.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L.genome. **Mol.Gen.Genet., 261**:259-266.

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILLARD, M.;LOUARN, J. 1996. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theor.Appl.Genet., 93**:458-462.

LASHERMES, P.; CROS,J.; MARMEY, P. & CHARRIER, A. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution, 40**:91-99.

OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; POWELL, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffe using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics, 87**:934-940.

OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; POWELL, W.; WAUGH, R. 1996. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. **Plant Cell Reports, 15**:337-341.

PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theor.Appl.Genet., 93**:41-47.

TANKSLEY, S.D. & McCOUCH, S.R. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potencial from the wild. Science 277:1063-1066

TEDESCO, N.S.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, L.; TEIXEIRA, T.A.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, C.C.H. 1999. Mapeamento de gene de resistência a ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) com marcador RAPD. **Anais do III SIBAC**, Londrina. (em impressão).

TEIXEIRA, T.A.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S.; PEREIRA, A.A.; SILVA, D.G. 1999. Padrão molecular de clones de cafeeiro diferenciadores de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. **Anais do III SIBAC**, Londrina. (em impressão).

TEIXEIRA, T.A.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, C.C.H. 1999. Caracterização de acessos de *Coffea* por marcadores RAPD. **Anais do III SIBAC**, Londrina. (em impressão).

GENETIC DIVERSITY AND MOLECULAR MAPPING OF COFFEE

Lashermes P.[1]; Combes M.C.[1]; Topart P.[2]; Anthony F [2]

[1] IRD, GeneTrop, BP 5045, F-34032, Montpellier, France
[2] CATIE, AP59, 7170 Turrialba, Costa Rica

The large number of named varieties and selections of arabica coffees hides the very narrow genetic diversity of the base populations from which they were selected (4). Historical evidence indicates that these base populations all descended from the few trees that survived various efforts to spread arabica coffee from Southern Arabia, now Yemen, into the main coffee-producing areas. The cultivars present therefore, a homogeneous agronomic behaviour characterised by a high susceptibility to many pests and diseases, and very low adaptability. Enlarging the genetic base and improvement of arabica varieties have become a crucial priority toward an economic and sustainable coffee production. Spontaneous accessions collected in the primary centre of diversity as well as wild relative *Coffea* species constitute a valuable gene reservoir for breeding purposes.

IRD aims to develop basic knowledges and genetic engineering strategies, required for an efficient and rational use of genetic resources. In recent years, molecular marker techniques have gained widespread applications in many fields of plant genetics and breeding. Regarding *C. arabica*, several lines of research are concerned (2).

GENETIC RESOURCES

In addition to germplasm collection screening for desired characteristics (3), molecular marker analyses are performed (13). These genetic diversity analyses have already increased our understanding of the relationships among coffee cultivars and between the cultivars and the spontaneous accessions collected in the primary centre of genetic diversity in Africa. We intend to propose improved management practices of collection and to assist breeding programmes in the identification of promising genitors.

GENOME CHARACTERISATION

C. arabica is the only polyploid species (2n =4x= 44) in the genus. By combining molecular markers (6, 10, 12) and DNA *in situ* hybridisation, we sought to gain insights into its genome organisation (8, 11). An amphidiploid structure was demonstrated and the diploid progenitor species identified. Further work should determine the degree to which the ancestral genomes have evolved in the amphidiploid, the chromosome meiotic pairing control, and the role of intergenomic interactions in gene expression.

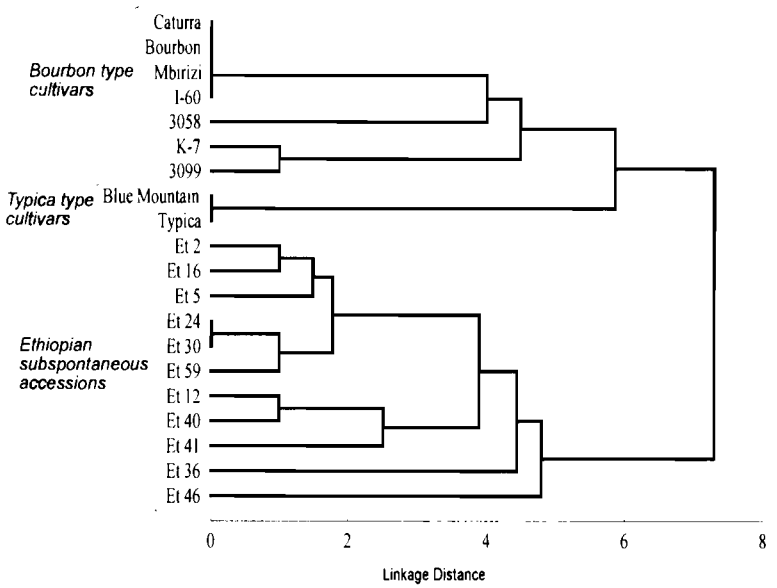


Fig. 1 Dendrogram of *Coffea arabica* accessions based on RAPD data and generated by single linkage cluster analysis (13).

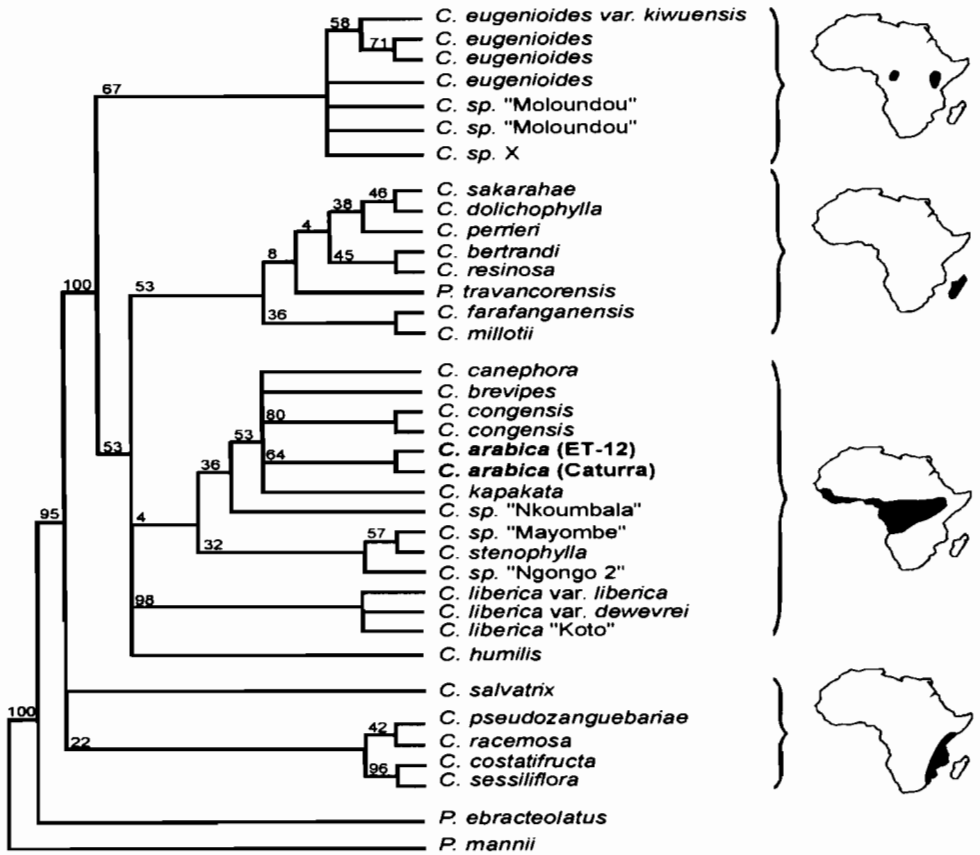


Fig. 2. Strict consensus Wagner tree resulting from parsimony analysis of ITS 2 (nuclear ribosomal DNA) sequence data. Numbers above the node represent bootstrap values (%). Geographical distributions of the majo groups are also indicated (10).

• GENOME MAPPING AND TAGGING OF USEFUL GENES

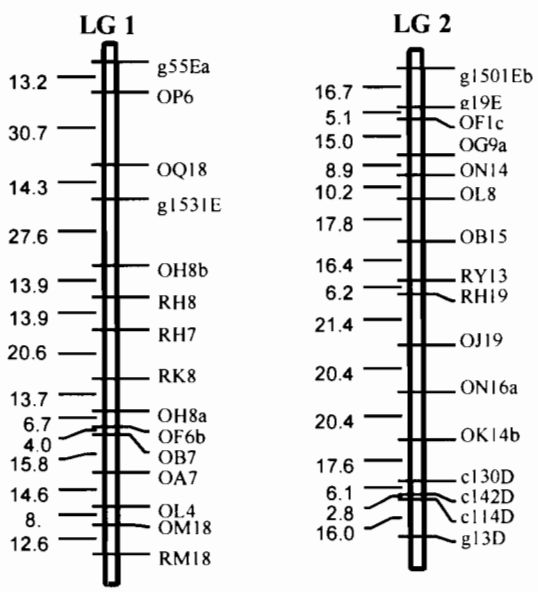


Fig. 3. Linkage groups 1 and 2 of the genetic map of *C. canephora* (16). Map distances in cM are indicated on the left side of linkage groups and marker locus name are on the right side.

A genetic linkage map of *C. arabica* is being constructed based on a F_2 population derived from a cross between an improved cultivar and a wild type. One objective is to determine the genome location and genetic contribution of genes controlling important traits of coffee plant. Gene cloning is also considered. Special emphasis is given to pest and disease resistances, quality-related traits, and male sterility (7, 9). Monitoring of gene introgression to *C. arabica* from wild diploid coffee species especially *C. canephora* and Timor Hybrid derivatives, is expected to be considerably facilitated by the development of molecular marker-assisted selection (14, 15). RAPD markers closely associated with the *T* gene of resistance to Coffee Berry Disease have been already identified (1).

REFERENCES

1. Agwanda, C., P. Lashermes, P. Trouslot, M.C. Combes, and A. Charrier. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to Coffee Berry Disease, *Colletotrichum kahawae*, in Arabica coffee. Euphytica, 97: 241-248

2. Anthony, F., B. Bertrand, P. Lashermes, and A. Charrier. 1997. La biologie moléculaire en appui à l'amélioration génétique du caféier Arabica. Plantations, recherche, développement, 6: 369-377

3. Bertrand, B., G. Aguilar, E. Bompard, A. Rafinon, and F. Anthony. 1997. Comportement agronomique et résistance aux principaux déprédateurs des lignées de Sarchimors et Catimors (*Coffea arabica* L.), évaluées au Costa Rica. Plantations, Recherche, Développement, 5: 312-321

4. Carvalho, A., 1988. Principles and practices of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: R. J. Clarke and R. Macrae (Eds) Coffee vol 4 : Agronomy, pp 129-165. Elsevier Applied Science, London.

5. Couturon, E., P. Lashermes, and A. Charrier. 1998. First intergeneric hybrids (*Psilanthus ebracteolatus* H. x *Coffea arabica* L.) in coffee-trees. Can. J. of Bot., 76: 542-546

6. Cros, J., M.C. Combes, P. Trouslot, F. Anthony, S. Hamon, A. Charrier, and P. Lashermes. 1998. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. Molecular Phylogenetics and Evolution, 9: 109-117

7. Dufour, M., F. Anthony, B. Bertrand, and A.B. Eskes. 1997. Identification et utilisation de caféiers mâles-stériles de *Coffea arabica* en Amérique centrale. Plantations, Recherche, Développement, 6: 401-407

8. Lashermes, P., M.C. Combes, P. Trouslot, F. Anthony and A. Charrier. 1996. Molecular analysis of the origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L.: Implications for coffee improvement. Proc. of the EUCARPIA meeting on tropical plants, Montpellier, 23-29

9. Lashermes, P., E. Couturon, N. Moreau, M. Paillard, and J. Louarn. 1996. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. Theor. Appl. Genet., 93 : 458-462.

10. Lashermes, P., M.C. Combes, P. Trouslot, and A. Charrier. 1997. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea L.*) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet., 94: 947-955

11. Lashermes, P., M.C. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D'hont, F. Anthony, and A. Charrier. 1999. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. Molecular & General Genetics, 261 : 259-266

12. Lashermes, P., J. Cros, M.C. Combes, P. Trouslot, F. Anthony, S. Hamon, and A. Charrier. 1996. Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea L.*. Theor. Appl. Genet. 93: 626-632

13. Lashermes, P., P. Trouslot, F. Anthony, M.C. Combes, A. Charrier. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: 59-64

14. Lashermes, P., S. Andrzejewski, B. Bertrand, M.C. Combes, S. Dussert, G. Graziosi, P. Trouslot, and F. Anthony. 1999. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). Theor. Appl. Genet. In press

15. Lashermes, P., C. Agwanda, F. Anthony, M.C. Combes, P. Trouslot, and A. Charrier. 1997. Molecular marked-assisted selection: A powerful approach for coffee improvement. 17th conference of ASIC, Nairobi (Kenya), 474-480

16. Paillard, M., P. Lashermes, and V. Pétiard. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet. 93: 41-47

MICROSATELLITES IN *Coffea arabica*: CONSTRUCTION AND SELECTION OF TWO GENOMIC LIBRARIES.

Vascotto F., Degli Ivanissevich S.[1], Rovelli P., Anthony F.[2], Anzueto F.[3], Lashermes P.[4], Graziosi G.

Dipartimento di Biologia, Università di Trieste, 34143 Trieste, Italy
[1] DPVTA. Università di Udine, Italy
[2] PROMECAFE Network, Guatemale City, Guatemala
[3] CATIE, Turrialba, Costa Rica
[4] IRD, Montpellier, France

INTRODUCTION.

Almost the entire world production of coffee is obtained by the cultivation of two species: *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. The two species provide beans with distinct organoleptic qualities and *C. arabica* is generally preferred for its smoother taste and reduced caffeine content. Moreover *C. arabica* accounts for about 70% of the total world coffee production (Clifford and Willson, 1985).

The commercial importance of *C. arabica* is met by intense research activities at the agronomic level by selection and production of new varieties and new cultivation techniques as for instance the "Cafe adensado" (Sera et al., 1994). Nevertheless the genetic improvement of the varieties as well as the controlled introgression of valuable genes from other species is somewhat hindered by the low knowledge on the genetics of *C. arabica*. Although some mendelian inherited loci are known, as for instance *Maragogype* (large beams and leaves) or *Caturra* (short stature), they are too few for building up a genetic map and the lack of a genetic map has obvious effect on breeding programmes.

Polymorphic DNA loci represent the obvious choice as marker for constructing a genetic map and indeed a number of polymorphisms are available as RAPD (Lashermes et al., 1996; Orozco-Castillo et al., 1994) and AFLP (Lashermes et al., 1999). Nevertheless the polymorphic bands detected by these two methods show a dominant behaviour: one band is either present or absent while intensity variations are generally unreproducible. Therefore these methods do not allow for distinguishing between the dominant homozygote and the heterozygote, both characterised by the presence of the same bands.

More informative are the polymorphisms based the microsatellites: they show codominant bands and therefore they allow for the identification of all possible genotypes as well as easy transfer of markers in different crosses.

These characteristics are of great relevance in constructing a genetic map (Paillard et al., 1996) as well as in marker assisted breeding programmes.

We undertook this research project in view of identifying an characterising polymorphic microsatellites.

MATERIAL AND METHODS.

Plant material.

The genomic libraries were constructed from DNA extracted from leaves of a plant of C. arabica var. Caturra which is part of the IRD (Montpellier) collection. The polymorphisms were assessed on a F_2 population of 12 plants obtained from the cross of Caturra x Wild Ethiopia (ET30) and selfing of the F_1. Unfortunately the parental and the F_1 plants are presently unaccessible and they could not be tested for heterozygosity.

DNA extraction and purification.

The DNA was extracted from young leaves, 2-3 cm, which were lyophilised immediately after collection. Since the quality of a genomic library depends very much on the quality of the starting DNA, particular attention was paid for the initial DNA extraction and purification. We adopted a modification of the extraction technique of Murray and Thompson (1980) and Orozco-Castillo et al (1994), as reported in detailed in the protocol below.

- Grind 0.12 g of lyophilised leaf in a mortar, add 3ml lysis buffer (4% CTAB, 100mM Tris-HCl pH8.0, 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 10.5µl ß-Mercaptoethanol for 15 ml of buffer, to be added at the time of the extraction)
- Following incubation for 1 h at 65°C, extract with 2.25 ml CHL/IAA (24:1) for 5'
- Centrifuge 5' at 12000 rpm and transfer the supernatant into a clean tube; precipitate with 0.6 volumes of isopropilic alcohol 10' at room temperature (1.8 ml for 3 ml of buffer)

- Centrifuge 15' at 12000 rpm, drain supernatant and dry the pellet very well (eventually at 65°C)
- Resuspend in 250µl of TE and incubate at 65°C for 15' with 2.5µl RNAase A (1 mg/ml)

Further purification of the extracts was performed as reported below.

- Add 45 µl 5M NaCl and shake by inversion; add 300 µl 2% CTAB, 100 mM Tris pH 8.0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA and shake by inversion
- Extract with 500 µl CHL/IAA wait 5' and centrifuge 5' at 12000 rpm then transfer the supernatant in a clean Eppendorf
- Precipitate for 1 h with the addition of 1.5 volumes of 1% CTAB, 50 mM TRIS pH 8.0 at room temperature and centrifuge at 12000 rpm for 10'
- After drying very well the pellet, remove the CTAB from the tube walls and resuspend in 75 µl 5M NaCl and 300 µl TE (incubate 10' at 56°C) and, if necessary, centrifuge 5' at 12000 rpm to eliminate undissolved particles
- Precipitate the DNA with 950 µl ethanol 100% (wait 10' at RT), centrifuge at 12000 rpm for 10'; wash the pellet with 500 µl ethanol 70%, wait 5' and centrifuge 5' at 12000 rpm
- Dry the pellet at 37°C and dissolve in 50 µl TE (eventually at 56°C)

Construction and enrichment of the genomic libraries.

Two genomic libraries were prepared as described by Rafalski et al. (1996), Morgante et al. (1998) with modifications as reported below. One library was enriched in $(TG)_n$ and the other one was enriched in $(ATC)_n$. The main steps of the procedure were the following:

Caturra DNA digestion with *Tsp509I*

DNA fragment selection (250-700 bp from agarose gels)

Fragment ligation to an adapter containing an *EcoRI* site and adequate primer sequences.

Enrichment in TG or ATC by DYNABEADS-DYNAL conjugated with biotin-strepavidin oligonucleotides complementary to TG and ATC;

PCR Amplification of the two libraries by priming the adapters

Control of the success of the selection procedure by Southern blot using the TG and ATC oligonucleotides as probes.

Purification of the two libraries by the Wizard-Promega kit.

Restriction of the genomic fragments by *EcoRI*.

Selective recovery of the digested fragments (250-700 bp) from agarose gel on DEAE NA45 filters.

Fragment cloning in the *EcoRI* site of -ZAPII (Stratagene, La Jolla, Calif.).

Phage packaging and infection of XL1-Blue MRF' strain.

Phage count and plating of the libraries.

Lifting on nylon membranes.

Screening of the libraries for the TG/ATC positives clones.

Sequencing and primer design.

The sequencing of the positive clones was performed by Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit (Amersham Pharmacia Biotec) following the producer indications.

Pairs of primers were designed on the regions flanking the microsatellites. The on line programmes Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts, USA) or *Primers!* (Williamstone Enterprises) were used, choosing a Tm of a 58°C .The constant tail KS (5'-TCGAGGTCGACGGTATC-3') was added to one of the primers for each primer pair.

Amplification and analysis of the microsatellites.

The microsatellites underwent touchdown PCR as reported by Hecker e Roux, 1996. A three primer system was developed: two primers were the locus specific primers, while the third primer was complementary to the constant tail of one of the primers and was tagged by a fluorochrome, either 6-FAM (6-carbossifluoresceine) or JOE (2',7'-dimetossi-4',5'-dicloro-6-carbossifluoresceine).

The amplification conditions were the following: 6 cycles, denaturation 45s at 94°C, elongation 45s at 72°C, annealing 45s with decreasing temperature from 60°C to 55°C; 34 cycles, denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, elongation at 72°C for 30s (8 mins for last cycle).

The amplified fragment were run on sequencing acrilamide gels in an automatic sequencer ABI 373A. The alleles identification was performed by the GENESCAN 672 (Perkin Elmer) software.

RESULTS

Constructing the genomic libraries.

The probability of finding polymorphic microsatellite depends very much on the procedure adopted for the construction of the libraries as well as on the enrichment strategy. Here we account for some relevant points of the strategy adopted.

As reported in the Material and Method section, we constructed two genomic libraries. The first library was enriched for the dinucleotide monomer sequence TG which was chosen on the

basis of the experience of various research groups on barley and other plants. The second library was enriched for the trinucleotide monomer sequence ATC which was chosen following hybridisation experiments. The DNA was digested with a few restriction enzymes including *Tsp509I* and hybridised with the following oligonucleotides: $(ATC)_{10}$, $(ACC)_{10}$, $(AAC)_{10}$, $(AAG)_{10}$. The best results were obtained with *Tsp509I* digestion for the oligonucleotide $(ATC)_{10}$, in fact the Southern blot showed a uniform profile where the majority of DNA fragments was below 1 Kbp.
The critical enrichment step was performed by conjugating the magnetic beads coated by streptavidin with the biotinilated oligonucleotide (ATC)10 or (TG) 13, the unbound DNA was discarded. The efficiency of enrichment was evaluated by hybridisation of the -ZAPII colonies with the chemiluminescent 5'-(DIG)3(ATC)10 or 5'-(DIG)3(TG) 13 oligomers. About 9% of the colonies gave a strong positive signal. We picked up only the positive colonies, thus introducing a second degree selection procedure.

The sequencing of the positive clones.
Most of the clones were short enough to be sequence in one run. About 70% of the (ATC)10/(TG) 13 positive clones contained a SSR. Here are reported some examples of the microsatellite sequences of the TG library:
GTGTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTG
CACACACACACACACACAAGCTCTCTCTC
TCTCTCTCTCT
TGTGTGTCTATGTATGTATGTATATATGTG
TGTGTGTATATGTGTGT
CACACACACACACACACAAGCTCTCTCTC
TCTCTCTCTCT
Besides the expected TG and the complementary AC repeats, compound microsatellites were obtained where the repeats could be: TA, CT or GA. Thus the sequencing to the clones allowed for the identification of the monomer sequence of microsatellites which were not specifically selected for. This result could be use in future projects for microsatellite production.

Primer designed.
Even if about 70% of the sequenced clones contained a microsatellite sequence, the number of primer pairs designed was much lower. Many clone sequences could not be used for designing primers for one or more of the following reasons:
No repeated sequence could be identified;
The insert was a chimera, i.e. composed by two or more DNA fragments of independent origin.
The microsatellite covered the entire insert and there was no space for designing the primers;
The microsatellite was too short, unlikely to be polymorphic;
The T_m of the two primers was too different;
The amplification conditions did not meet the requirements established "a priori". We fixed some amplification parameters which must be common to all primers to allow for the development of multiplex when analysing large sample population.
Because of all these limitations only 30% of the sequenced clones allowed for primer designed.

Identification of the polymorphic microsatellites.
The identification of the polymorphic loci was performed analysing DNA extracted from the cultivars Mundo Novo and Bourbon, from the 12 F_2 plants of the segregating population and from two plants of the same parental lines (ET30 and Caturra) of the F_2. The identification of the alleles was performed on sequencing gels because we could expected alleles differing only for 2 base pairs.
When using the same amplification conditions for all primers as reported in the Material and Method section, about one third of the primer pairs gave no amplification product. Presumably these primers require adjustments for the amplification conditions and they have been momentarily abandoned. Many of the remaining primer gave monomorphic bands. Only 25% of the primers which gave an amplification products eventually gave polymorphic bands either on the varieties or on the F_2 population.
Even if we analysed a limited number of varieties, frequently we obtained multiple alleles, from 2 to 5 alleles. Usually each single plant had either one or two alleles, except the locus E12-3CTG who gave 3 or 4 bands per plant.

DISCUSSION.

The construction of the genomic library enriched in microsatellite sequences proved to be rather complex. Nevertheless the results so far obtained are very promising and there are high probabilities of finding a reasonable number of polymorphic microsatellites. In facts more than 3% of the sequenced clones allowed for the identification of polymorphic loci or, if we refer to the genomic libraries, we expect that about 0.2% of the clones contain a polymorphic sequence. We estimated

that our enriched genomic libraries should have about 50,000 clones still to be screened and therefore we could expect about a hundred polymorphisms to be identified.

An open question is the redundancy of our genomic libraries. Until now, we had very few clones sharing the same sequence or partial sequence identity. Nevertheless it is reasonable to foresee an increase of clones containing sequences already known. Thus the total number of potential polymorphisms should be corrected for the redundancy but, for the moment, we cannot evaluate the correction value.

Coffea arabica is an autogamous plant and a reasonable percentage of homozygosity is expected. Moreover, it has been reported that the genetic base of the cultivated varieties is rather narrow (Bertraud and Charrier, 1988). Under these circumstances we would expect a reduced variability even at the microsatellite level. Our data do not allow for a comparison with other vegetal species on the

Acknowledgements: The research project has been supported by EU, INCO Contract n. ERBIC18CT970181.

REFERENCES.

Bertraud J., and A. Charrier. 1988. Genetic Resources of Coffea. In "Coffee", Vol. 4, Agronomy, R.J. Clarke and R. Macrae Ed.s, Elsevier Applied Science, London pp1-41

Clifford M.N., and K.C. Willson. (Editors) 1985. Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage. London, Croom Helm,

Hecker K.H., and K.H. Roux. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. Biotechniques 20: 478-485.

Lashermes P., S. Andrzejewski, B. Bertrand , M.C. Combes , S. Dussert , G. Graziosi, P. Trouslot, and F. Anthony. 1999 Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.) Theor. Appl. Genet. (in print).

Lashermes, P., P. Trouslot, F. Anthony, M.C. Combes, and A. Charrier. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica.* Euphytica 87:59-64

Morgante, M., A. Pfeiffer, I. Jurman, G. Paglia , and A.M. Olivieri. 1998. Microsatellite markers in plants. In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds) Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals. Chapman and Hall, pp. 206-208,

Murray, M.G., and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.

Orozco-Castillo, C., K.J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell. 1994 Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87: 934-940.

Paillard, M., P. Lashermes, and V. Pétiard. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet . 93: 41-47.

Rafalski, J.A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre, and S.V. Tingey. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E (eds) Nonmammalian genomic analysis: a practical guide. Academic Press, London New York, pp.75-134.

Sera, T., F.Androcioli, R.M.L. Cardoso, M.C.L.L. Dias, A. Guerreiro, and E. Silva. 1994. International Symposium on High Density Planting of Coffee Tree. p293-294 IAPAR

OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM *COLLETOTRICHUM SPP.* ISOLADOS DE CAFEEIRO (*COFFEA ARABICA*)

Rocheta[1], M.,Coelho[1,2], T., Bessa[1], A., Dias[2], A.,Várzea[1], V., Rodrigues Jr.[1], C. J., Tenreiro[2], R.

[1]Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, IICT, Quinta do Marquês, 2780 – Oeiras, Portugal
[2]Centro de Genética e Biologia Molecular e Departamento de Biologia Vegetal, FCUL, Campo Grande, 1679-016 Lisboa, Portugal.

INTRODUÇÃO

Dos fungos fitopatogénicos, o género *Collletotrichum* é um dos mais importantes das regiões tropicais e subtropicais com inúmeros hospedeiros nos quais ocasiona danos económicos muito elevados.

Três espécies distintas de *Colletotrichum* têm sido isoladas de cafeeiro *Coffea arabica*: o *C. kahawae* J. M. Waller & P. D. Bridge, agente causal da antracnose dos frutos verdes do cafeeiro, também conhecida por "coffee berry disease" ou C.B.D., o *C. gloeosporioides* Penz, que só infecta os frutos maduros (Waller, 1992) originando o "brown blight" e o *C. acutatum* Simmons, uma espécie saprófita. Das três espécies, a única que é limitante da cultura do Arabica em África é o *C. kahawae*, originando quebras de produção da ordem dos 70-80% se não se efectuarem tratamentos químicos (Masaba e Waller, 1992).

O trabalho realizado no CIFC com numerosos isolamentos de *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* tem permitido antever a existência de patótipos em *C. kahawae*, através de testes de patogenicidade em hipocótilos (Rodrigues Jr., *et al.*, 1992; Várzea *et al.*, 1993). Porém o estudo da biodiversidade do género *Colletotrichum* e eventual caracterização de patótipos de *C. kahawae* pode hoje ser tentada por meio de métodos da biologia molecular.

Tendo por objectivo identificar marcadores moleculares do género e da espécie úteis no diagnóstico, a abordagem molecular às várias espécies e isolados de *Colletotrichum* do cafeeiro (**Tab.1**) baseou-se essencialmente em técnicas de PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies e isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de cafeeiro e existentes no CIFC são provenientes de vários países: Angola, Brasil, Burundi, Camarões, China, Colômbia, Etiópia, Malawi, Quénia, Ruanda e Zimbabwe. A colecção inclui ainda um isolado de *C. gloeosporioides* obtido de caju e proveniente do Brasil (**Tab. 1**)

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* obtidos de cafeeiro.

CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DAS FERRUGENS DO CAFEEIRO			
Espécies	**Designação**	**Origem**	**Ano**
Colletotrichum kahawae	A6/2	Angola (CIFC)[1]	1992
"	A6	Angola (CIFC)[1]	1992
"	A6/4	Angola (CIFC)[1]	1992
"	B1	Burundi CIRAD)	1992
"	B2	Burundi CIRAD)	1992
"	Cal	Camarões CIRAD)	1992
"	E3	Etiópia [2]	1992
"	E4	Etiópia [2]	1993
"	E5	Etiópia [2]	1993
"	E9	Etiópia [2]	1992
"	E10	Etiópia [2]	1993
"	E17	Etiópia [2]	1992
"	E20	Etiópia(SBC– IMI)	1993
"	M2	Malawi (CIFC)[1]	1988
"	M4	Malawi (CIFC)[1]	1991
"	M6	Malawi(SBS– MI)	1993
"	Q1	Quénia (CRF)	1986
"	Q2	Quénia [3]	1989
"	Q4	Quénia (CRF)	1992
"	R1	Ruanda (CIFC)[1]	1989
"	Z1	Zimbabwe (CIFC)[1]	1991
"	Z2	Zimbabwe (CIFC)[1]	1991
Colletotrichum gloeosporioides	A3	Angola (CIFC)[1]	1989
"	Bcal	Brasil (isolado de cajueiro) (UFAL)	1994
"	Br	Brasil	1993
"	CH1	China (CIFC)[1]	1993
"	CH3	China (CIFC)[1]	1993
"	CH4	China (CIFC)[1]	1993
"	Col	Colômbia(cenicafe	1994
"	E11	Etiópia[2]	1992
"	M1	Malawi (CIFC)[1]	1988
"	M5	Malawi(SBS–IMI)	1992
Colletotrichum acutatum	Ac	Angola (CIFC)[1]	1992
"	CCP	Ruiru-Quénia[4]	1996

CENICAFE, Colômbia; CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro; CIRAD – Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique por le Développement; CRF – Coffee Research Foundation, Quénia; SBS – School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich; IMI – International

Mycological Institute, Londres; UFAL – Universidade Federal de Alagoas; (1) – Isolado e identificado no CIFC; (2) – Isolamento fornecido pelo Dr. Biratu; (3) – Fornecido pelo Dr. Hindorf; (4) – Coffee Research Fondation, Quénia.

Neste trabalho foram usadas essencialmente técnicas de PCR utilizando o aparelho RoboCycler da Stratagene.

Para amplificar um fragmento do gene que codifica o rRNA 18S e para a amplicação de regiões ITS foram utilizados os "primers", Tr1 (5'- GTTTCTAGGACCGCCG-3') e Tr2 (5'-CTCAAACTTCCATCGAC–3') (Bock *et al.*, 1994) e os "primers" ITS_2, ITS_3, ITS_4 e ITS_5, respectivamente (White *et al.*, 1990). A temperatura de "annealing" em ambos os casos foi de 56°C, 1 minuto durante 35 ciclos.

Na técnica de RAPD foi utilizado o primer OPC–11 (5'- AAAGCTCGGG; Operon Technologies), com um temperatura de "annealing" de 37°C, 2 minutos durante 35 ciclos.

Para amplificação de sequências de microsatélites foram utilizados os "primers" referidos na Tabela 2 usando o "touchdown-PCR" (Longato & Bonfate, 1997)). A temperatura inicial de "annealing" foi de 65°C variando 0,5°C durante 10 ciclos seguindo-se 25 ciclos a 60°C.

Tabela 2. Sequências dos "primers" utilizados na amplificação de microsatélites.

SEQUÊNCIA 5'– 3'
GACA GACA GACA GACA
GTGC GTGC GTGC GTGC
GAC GAC GAC GAC GAC
AGC AGC AGC AGC AGC AGC TY
YT AGC AGC AGC AGC AGC AGC

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MARCADORES BASEADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES QUE CODIFICAM O rRNA RIBOSSOMAL

Em todos os isolados de *C. kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, foi amplificado um fragmento do gene que codifica o rRNA 18S, utilizando os "primers Tr1 e Tr2. Os resultados obtidos não permitiram qualquer diferenciação entre as espécies testadas.

Nestas espécies foram também amplificadas sequências intergénicas do rDNA (ITS – Internal Transcribed Spacer). Todos os isolados de *C. kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* apresentaram um padrão de bandas de tamanho semelhante para cada uma das regiões amplificadas, ITS1 (280 pb), ITS2 (350 pb) e ITSt (590 pb).

As regiões amplificadas são conservadas nestas espécies não tendo potencial como marcador molecular diagnosticante do agente da CBD.

O facto de não se ter detectado nenhum polimorfismo de dimensão nestas regiões não exclui a hipótese de existirem polimorfismos de restrição. Para testar esta hipótese para cada um dos amplificados de todos os isolados de *Colletotrichum*, está em curso a restrição com várias enzimas (ARDRA- Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis).

Pelo facto da amplificação de uma região do gene que codifica o rRNA 18S e regiões ITS não ter revelado nenhum polimorfismo de dimensão, não se exclui a hipótese de poder haver diferenças ao nível da composição nucleotídica em cada uma destas regiões, só possível de determinar através da sequenciação de cada uma das referidas regiões em cada um dos isolados.

MARCADORES BASEADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS REPETIDAS

Marcadores baseados no perfil RAPD

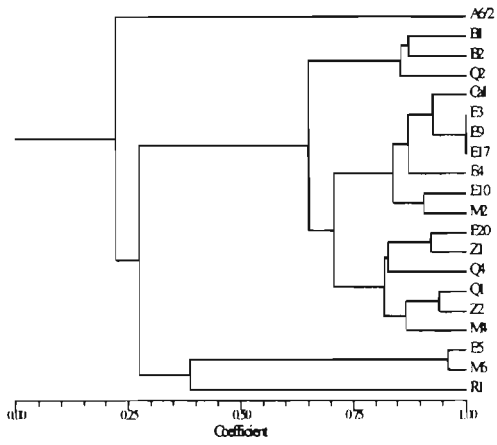
Adicionalmente e com o objectivo de detectar polimorfismos entre indivíduos está a ser aplicada a técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a todos os isolados (Welsh e McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD pode incluir: alterações nucleotídicas que impedem a amplificação por não complementaridade num local de ligação ao primer, delecção do local de ligação, inserções que distanciam os locais de ligação de forma a ser impossível a amplificação, inserções ou delecções que alteram o tamanho do produto de amplificação.

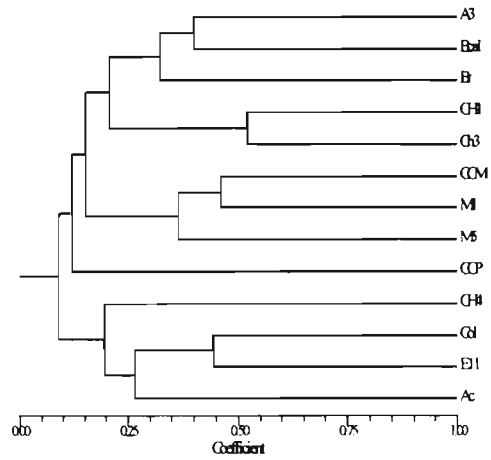
Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o facto de se comportarem como marcadores genéticos dominantes herdados de forma mendeliana. Uma banda RAPD só pode ser considerada um marcador de comportamento mendeliano depois de verificada a sua segregação na geração seguinte. De salientar que este princípio aplica-se a todo e qualquer marcador molecular.

A aplicação do primer OPC – 11 aos isolados das diferentes espécies permitiu separar claramente *C. kahawae* de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (figura não apresentada). Na quase totalidade dos isolados de *C. kahawae* os fragmentos amplificados situam-se entre 800 e 1800 pb, enquanto nos isolados das outras espécies se observam fragmentos de dimensões inferiores (300 a 800 pb). A análise numérica dos resultados

Figura 1. Dendrogramas dos isolados de *C. kahawae* (a), *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (b) obtidos a partir dos perfis RAPD com o "primer" OPC – 11, utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA.



(a)



(b)

obtidos com este "primer" (**Fig 1.**) permite ainda concluir que o grau de heterogeneidade observado em *C. kahawae* é contudo inferior ao de *C. gloeosporioides*.

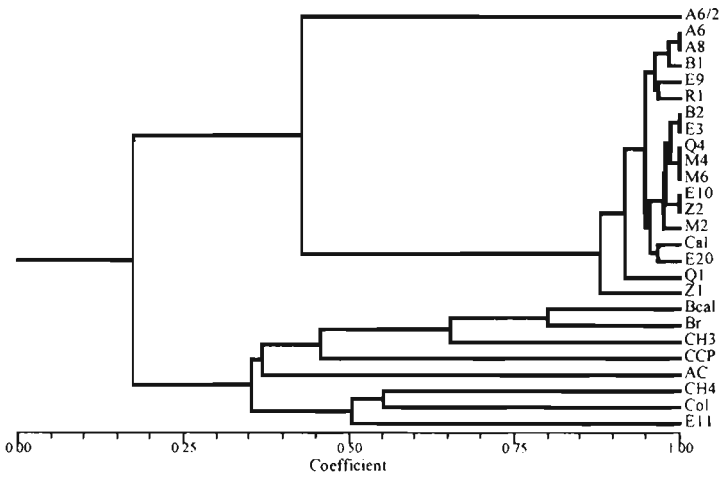
Marcadores baseados na amplificação de Microsatélites

No início dos anos 80 foi demonstrado que os genomas eucariotas são povoados por diferentes classes de sequências simples repetidas (Hamada *et al.*, 1982; Tautz & Renz, 1984). Essas sequências simples repetidas ("SSR- Simple Sequence Repeats") também denominadas "microsatélites", são constituidas por pequenos motivos com 1- 4 nucleótidos, repetidos em tandem (Duncan *et al.*, 1998). Estas sequências simples encontram-se distribuídas ao acaso e formam loci genéticos muito polimórficos, que, uma vez amplificados por PCR, constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares hoje disponível. A utilização de sequências de microsatélites como local de ligação de um primer especifico permite a obtenção de marcadores moleculares ao nível da espécie (bandas comuns aos indivíduos da mesma espécie) e simultaneamente a diferenciação dos isolados através de um perfil de amplificação característico (bandas que diferem entre isolados). Obtém-se assim uma diferenciação inter e intraespecífica.

Para a amplificação destas regiões de *Colletotrichum* foram utilizados primers simples e primers com "âncora" na extremidade 3' (Tab. 2). Conjugando o tipo de primer com a temperatura a que é feito o "touchdown PCR" foi possível obter um perfil reprodutível característico de cada isolado de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum*.

A partir dos resultados obtidos com quatro "primers" construiu-se o dendrograma apresentado na **figura 2**.

Figura 2. Dendrograma dos isolados de *C. kahawae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* obtido com a análise de microsatélites, utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA.



Os resultados obtidos com a amplificação de sequências usando "primers" para microsatélites permite claramente estabelecer um grupo de isolados de *C. kahawae* e um outro grupo de isolados formado por *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Estes dois grupos apresentam uma semelhança de 17%. Os padrões de amplificação dos isolados de *C. kahawae* revelaram-se muito uniformes comparativamente aos isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, um resultado que está de acordo com o obtido com o perfil RAPD (Fig.1). Adicionalmente, esta técnica permitiu obter marcadores moleculares para as três espécies de *Colletrotrichum* para além de estabelecer um "fingerprinting" para cada indivíduo.

Este trabalho foi financiado pelo projecto Praxis P/2/2.1/BIA/309/94

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bock, M., Maiwald, M. Kappe, R., Nickel, P. & Naher, H. (1994). Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses* 37, 79-84.

Duncan, J. M., Cooke, D., Birch, P. & Toth, R. (1998). Molecular variability in sexually reproducing fungal plant pathogens. *In*: P. D. Bridges, Y. Couteaudier & J. M. Clarkson (Eds.), *Molecular Variability of Fungal Pathogens* (pp.19-39) Oxon, UK: C.A.B. International.

Hamada, H., Petrino, M. G. & Kakunaga, T. (1982). A novel repeat element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 6465-6469.

Longato, S. & Bonfate, P. (1997). Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.* 4: 425-432.

Masaba, D. & Waller, J. M. (1992). Coffee berry disease; the current status. *In*: J. A. Bailey e M. J. Jeger (Eds.), *Colletotrichum: biology, pathology and control* (pp. 237-249) Oxon, UK: C. A.B. International.

Rodrigues Jr, Várzea, V. & Medeiros, E. (1992). Evidence for the existence of physiological races of *Colletotrichum coffeanum* Noack *sensu* Hindorf. *Kenya Coffee* 57, nº 672: 1477-1420

Tautz, D. & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive componements of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127-4138.

Várzea, V. M. P., Rodrigues Jr., C. J., Medeiros, E. F. (1993). Different pathogenicity of CBD isolates on coffee genotypes. *In*: *Proceedings of the 15th International Scientific Colloquium on Coffee*, Montpellier, 6-11 June 1993- ASIC (Paris) pp. 303-308.

Waller, J. M. (1992). *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. *In*: J. A. Bailey e M. J. Jeger (Eds.), *Colletotrichum: biology, pathology and control* (pp. 167-185) Oxon, UK: C.A.B. International.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Finger-printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (ed.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322).

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J. Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

GENETIC FINGERPRINTING OF COFFEE LEAF RUST DIFFERENTIALS WITH RAPD MARKERS

A. Santa Ram & H.L. Sreenath

Tissue Culture & Biotechnology Centre Coffee Board, Manasagangothri Mysore - 570 006

SUMMARY

Leaf rust is a major disease of coffee known to be causing severe crop losses. World wide efforts to combat this disease by various means revealed that resistance in the coffee plant and virulence in the rust pathogen (Hemileia vastatrix) are conditioned by a gene-for-gene host-pathogen relationship. Thus, known genotypes of coffee manifest resistance to specific sets of races of the rust fungus. There are 14 such differential hosts in the gene bank of CCRI. These are, Bourbon, Kents, S. 288, $S12$ Kaffa, Geisha, Agaro, Cioccie, HDT-A, HDT-R, Blue Mountain x Cioccie, S. 333 x Dilla & Alghe (S.25^4), Dilla & Alghe x S.333 (S.25^9) and Blue Mountain x S_{12} Kaffa (S.2666) in Coffea arabica. Two differential hosts are drawn from other species of Coffea. They are C. racemosa and C. congensis. One genotype of C. arabica by name Rume Sudan manifests a high degree of field resistance, presumed to be horizontal resistance. The present study was undertaken in a bid to identify DNA markers which distinguish each of the differentials. Preliminary data on DNA polymorphism indicates clear distinctions among the differentials. Cluster analysis indicated a large degree of similarity among the genotypes of C. arabica which fell into two major clusters.

INTRODUCTION

Perennial plantation crops have a long breeding and selection cycle. Discerning segregations in F_2 generation in these crops is very difficult at the juvenile stage. Thus, genetic analysis of plantation crops like coffee by conventional methods proves itself to be a task of considerable dimensions. Molecular markers which are directly derived from DNA are reliable, free from environmental influences and can be assayed at any stage of plant growth with any type of tissue. Recent advances in the field of plant molecular genetics have evolved a series of DNA markers. Notable among them are restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), (Botstein *et al.*, 1980) random amplified polymorphic DNA (RAPDs) (Williams *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990), amplified fragment length polymorphims (AFLPs) and simple sequence repeats (SSRs) or microsatellites (Weber and May, 1989).

Out of the various DNA markers, PCR based RAPDs are relatively simple to generate and are ideally suited for a breeder's laboratory. In basic PCR, two selected primers of known nucleotide sequence are used to amplify the specific gene of interest (Mullis and Faloona, 1987). Thus, PCR is an effective tool in screening for the presence or absence of a gene of interest in a variety of target DNAs. In contrast, a simple primer of arbitrary nucleotide sequence is used in RAPD assay. Earlier work on RFLPs and RAPDs of coffee evaluated their use as indicators of phylogeny and genetic diversity (Berthou *et al.*, 1983; Orozco-Castillo *et al.*, 1994,1996; Lashermes *et al.*,1995). Efforts were also devoted towards developing linkage maps of coffee using RFLP and RAPD data (Paillard *et al.*, 1996). Thus, it is noted that research work linking these markers to important agronomic traits such as disease or pest resistance is lacking. However, a lot of back ground information is available on the genetics of rust disease resistance in coffee (Eskes,1989) and several host types manifesting differential resistance to the pathogen races are identified.

In the genus *Coffea* L., *C. arabica* L. is the only tetraploid species (2n=4x=44) manifesting an often-self-pollinating reproductive behaviour. All other species of the genus are diploid (2n=2x=22) and self-incompatible. Arabica is commercially the most important species and is also the one susceptible to a variety of pests and diseases. Of particular importance among the diseases of arabica coffee is the leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* B. et Br. Arabica manifests specific resistance against races of the rust fungus. In the germplasm bank of Central Coffee Research Institute (CCRI) there are 14 host types of *C. arabica* and 2 host types derived from diploid species of *Coffea*, viz. *C. racemosa* Lour. and *C. congensis* Pierre. There is also a wild *C. arabica* collection known as Rume Sudan which manifests non-specific resistance to the rust fungus. Present study is conducted on these materials manifesting a divergent spectrum of reactions to the rust races and the observations are presented.

MATERIALS AND METHODS

Materials of the study

Fourteen host physiologic types of *Coffea arabica* viz. Bourbon (E), Kents (D), S.288(G), S_{12} Kaffa (W), Geisha (C), Agaro(J), Cioccie (J), Rume

Sudan (HR), Hibrido- de-Timor (HDT-A and R), Blue Mountain x Cioccie (Y), Blue Mountain x $_{12}$ Kaffa (S.2666)(O), S. 333x Dilla & Alghe (S.2574)(V), Dilla & Alghe x S.333 (S.2579)(Z) and one each of *C.racemosa* (F) and *C.congensis* (B) and wild arabica Rume Sudan showing high degree of horizontal resistance (HR) provided the material for the present study. Their genotypes and resistance groups are summarised in **table1**. Host types studied can be classified into four distinct groups as follows:

Table-1: Coffee leaf rust differentials used in the study

Differentials	Resistance genes	Resistance group	Reaction
Coffea arabica			
Arabicas			
Bourbon	S_H5	E	highly susceptible
Kents	$S_H2, 5$	D	highly susceptible
Geisha	$S_H1, 5$	C	moderately susceptible
S_{12} Kaffa	$S_H1, 4, 5$	W	moderately susceptible
Cioccie	$S_H4, 5$	J	moderately susceptible
Agaro	$S_H4, 5$	J	moderately susceptible
Rume Sudan	-----	HR	highly resistant
Arabicoids			
S.288	$S_H3, 5$	G	moderately resistant
Hibrido-de-Timor	$S_H6, 7, 8, 9$	A	highly resistant
Hibrido-de-Timor	S_H6	R	highly resistant
Hybrids			
Blue Mountain x Cioccie	$S_H2,4,5$	Y	moderately resistant
Blue Mountain x S_{12} Kaffa	$S_H1,2,4,5$	O	moderately resistant
Dilla & Alghe x S. 333	$S_H1,3,5$	Z	moderately resistant
S. 333 x Dilla & Alghe	$S_H1,2,3,5$	V	moderately resistant
Diploid species			
Coffea racemosa	..	F	highly susceptible
Coffea congensis	..	B	moderately resistant

Arabicas: These are tetraploids derived from wild arabicas and are considered as pure arabica genotypes.

Arabicoids: These are also tetraploids derived from the putative spontaneous hybridization of *C. arabica* with diploid species like *C. liberica* (S. 288, S. 333) or *C. canephora* (HDT).

Hybrids: These hosts are also tetraploids derived from artificial hybridization of arabicas and the arabicoids or between arabicas.

Diploid species: These host types belong to the diploid constellation of the species of *Coffea*.

DNA isolation: High molecular weight genomic DNA was isolated from the young leaves of field grown plants. About 10-15g of young coffee leaves were ground to a fine powder in LN_2 in a pre-chilled mortar and the owder was scooped into four Oakridge centrifuge tube containing 10 ml of pre-warmed (60°C) extraction buffer (2% cetrimide (SRL) (w/v), 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM TrisHCl pH.80) containing 1% PVP and 0.2% β-mercaptoethanol which were added to the buffer immediately before use. This extraction mixture was incubated in a waterbath at 60°C for one hour with frequent stirring of the contents. To this, 0.6 volume of chloroform-isoamylalcohol (24:1) reagent was added and the contents of the tubes thoroughly mixed. Then the tubes were spun at 10,000 rpm in a refrigerated high speed centrifuge (Sigma, Germany) for about 15 min. at 4°C to separate the phases. The upper aqueous phase **was** transferred

to fresh pre-cooled oakridge tubes without disturbing the interphase. To this, 0.5 volume of ice-cold isopropanol was added. At this stage, the DNA precipitated as a whitish net work. DNA was pelleted by spinning the tubes at 12,000-14,000 rpm at 4°C for 15-20 minutes. DNA pellet was washed with 10mM ammonium acetate in 70% ethanol. The tubes were again spun at 10,000 rpm for 10 minutes and the washing solution was decanted. DNA pellet was dried under vaccum for about 30 minutes. Finally the pellet was dissolved in 1000µl TE (10 mM Tris HCl pH 8.0) –1 mM EDTA) buffer. These samples were stored at -76^0 C in an ultra freezer for further use.

PCR Amplification- Components & Conditions

Reaction mixture for PCR composed of 2.5 µl standard assay buffer (10X), 2 units of Taq DNA polymerase (Genei, India), 400 µM dNTPs, 25ng of arbitrary primer (10-mer) (Operon Tech. Inc. USA) and 75 ng of template (sample) DNA in a total volume made upto 25 µl. with sterile distilled water. The sequences of the primers used in this study are presented in **table 2**.

TABLE-2: decamer primers used in the study

Primer	Nucleotide Sequence
	5` 3`
OPA - 01	CAGGCCCTTC
OPB - 12	CCTTGACCGA
OPF - 04	GGTGATCAGG
OPF - 06	GGGAATTCGG
OPF - 07	CCGATATCCC
OPF - 15	CCAGTACTCC
OPAA - 01	AGACGGCTCC
OPAA - 12	GGACCTCTTG
OPAT - 01	CAGTGGTTCC
OPAT - 02	CAGGTCTAGG
OPAT - 11	CCAGATCTCC
OPAT - 18	CCAGCTGTGA

Amplification reactions were carried out in a peltier thermal cycler PTC 200 DNA Engine (MJ Research, USA) with the following programme.

Step - I 94° C - 3 min (Initial denaturation)

Step–II 45 cycles of 94° C - 30 sec. (Denaturation)
36° C - 1 min. (Annealing)
72° C - 2 min (Chain extension)

Step-III 72° C - 10 min (Final chain extension)

Electrophoresis

PCR products were subjected to sub-marine electrophoresis (Biometra, Germany) at 10v/cm in an agarose gel of 1.2% strength with 1X TBE as tray and gel buffer to visualise RAPD's. Either a 100 bp ladder or λ DNA digested with EcoRI and Hind III or Hind III restriction enzymes was used as a standard molecular weight marker. The RAPD profiles were recorded by visual observation of ethidium bromide stained gels besides being photodocumented in a gel documentation system (Bio-Rad, USA).

Analysis

Observed band patterns were analysed using the Unweighed pairgroup method of analysis (UPGMA) algorithm to understand the similarities and relationships of the genotypes studied and the results are presented in a dendrogram (**Fig. 6**).

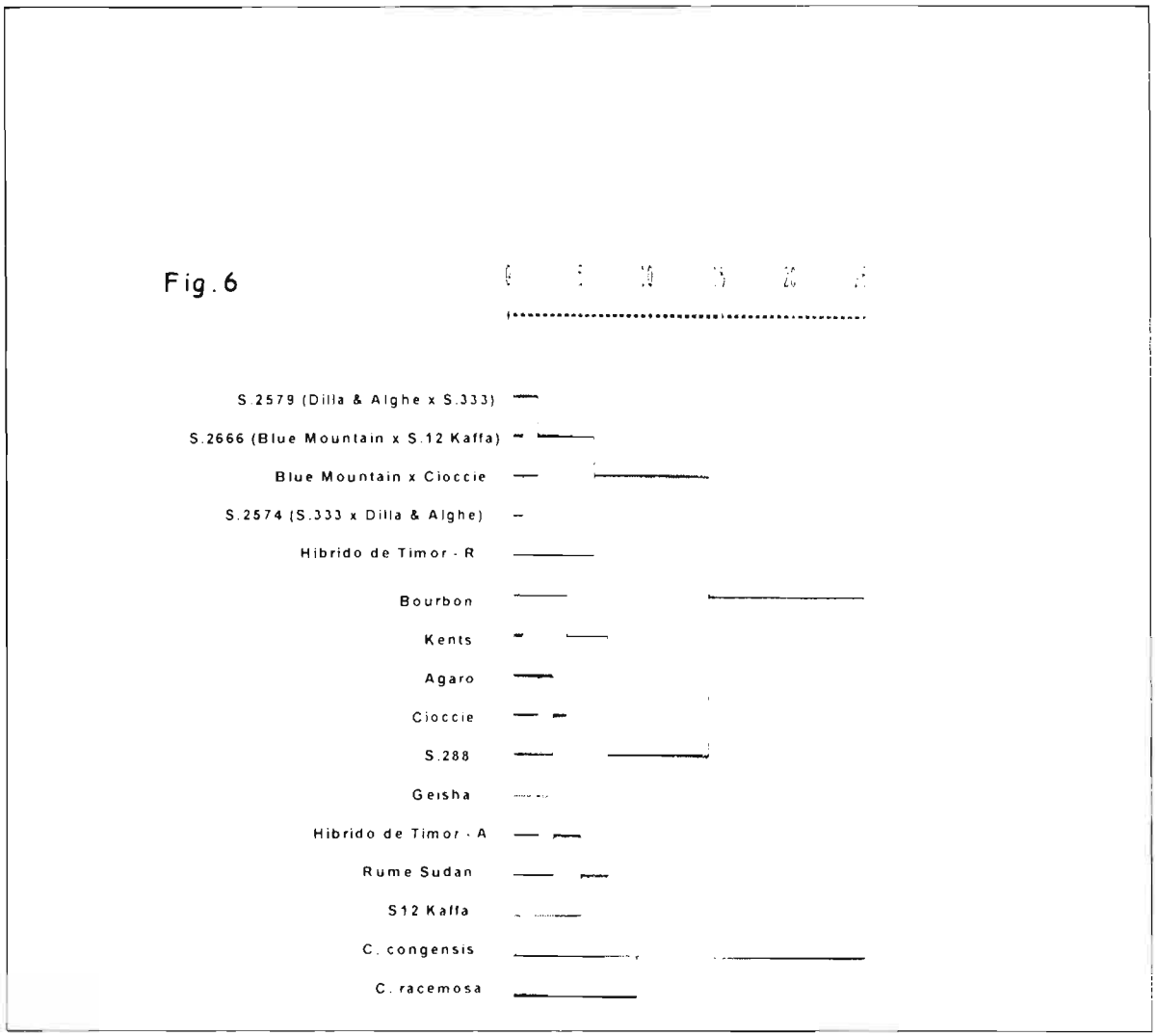


Fig. 6 Dendrogram showing the clustering of coffee leaf rust differentials.

RESULTS & DISCUSSION

DNA polymorphism data generated on 16 host types of coffee with 12 primers revealed genomic diversity by way of different band patterns (**Fig 1,2,3,4**). A total of 132 RAPD loci were visualised from the PCR products of these primers. Of these 85 were from *C. arabica* and 47 were from *C. congensis* and *C. racemosa*. Within the RAPD bands of *C. arabicas* about 77% were polymorphic. This high degree of polymorphism could be a reflection of the cryptic genetic variations among *Arabica* varieties which may have arisen as a means of local adaptations in the diverse geographic locations from where they were drawn. The primers OPA-01 and OPAT-18 distinguished most of the genotypes by producing characteristic product profiles. (**Fig. 2, 3**). The other primers generated products which can be used to distinguish one host type or the other. However, within each of the groups the genomic diversity was less obvious.

An interesting observation that came to light in this study is the distinction between HDT genotypes. HDT-A genotype is unique in that it carries the rust resistance genes S_H6, 7, 8 and 9 all of which are inferred to be derived from *C. canephora*. (Bettencourt *et al.*, 1992). Thus, it is heterozygous at the two possible loci conditioning resistance. Besides this heterozygosity, the two loci carrying different S_H genes makes this genotype very distinct with very durable resistance (Ram 1995). HDT-A produces segregants which are grouped into another resistance class 'R'(HDT-R). In the present study, it is observed that some of the tested primers distinguish HDT-A and HDT-R by some RAPD

bands(**Fig. 5**).

Besides the above distinctions each of the tested primers also generated a number of common bands from all genotypes of arabicas, arabicoids and the hybrids. Besides being monomorphic, these can be perceived as a part of constitutive DNA which makes *C. arabica* a species of distinction. Several of these bands could not be observed in the RAPD profiles of the diploid species *C. racemosa* and *C. congensis* (**Fig. 1, 2, 3, 4**). Among the arabica descendants (Arabicas, Arabicoids and the Hybrids) there are some DNA fragments which appear to be constitutive but are absent in a few host types. This is a possible indicator of the dynamic genomic differentiation (**Fig. 3, 4**).

The two host types of diploid species *C. racemosa* and *C. congensis* could also be distinguished from all arabica descendants as well as within themselves by the RAPD bands generated by all the primers. Possible homologies of DNA of these species with that of *C. arabica* is revealed by some primers (**Fig. 3**). These are indicative of the genomic distinction of *Coffea* and the possible interspecific gene flow among the species of this genus (Orozco-Castillo *et al.* 1994).

From the dendrogram (**Fig.6**), it can be inferred that the genotypes Bourbon and Kents are very closely related. The Ethiopian genotypes S_{12} Kaffa, Agaro, Geisha and Cioccie are similar and manifest a close similarity with Rume Sudan, Bourbon and Kents reflecting the large similarity of all Arabicas. Interestingly, the Arabicoids S.288 and HDT-A also exhibit a close similarity with this group indicating the probable involvement of Typicoid Arabicas in their evolution. The hybrids S.2574 (S.333 x Dilla & Alghe), S.2579 (Dilla & Alghe x S.333), S.2666 (Blue Mountain x S_{12} Kaffa) and Blue Mountain x Cioccie share a closely similar band pattern with HDT-R. Geographic origin of S.288 and S.333 (one of the parents of S.2574 and S.2579) can be traced back to the Doobla Estate in Chikmagalur District. Their putative derivation from Arabica-Liberica hybridization is reflected in the close similarity of their RAPD pattern. Relative distinctness of HDT-A and R genotypes is brought out in this analysis. Inspite of all the clear distinctions and 77% of genetic polymorphism, Arabicas, Arabicoids and Hybrids manifest a close clustering of genotypes with genetic distances ranging from 0 to 5. The species *C. racemosa* and *C. congensis* being diploids clustered distinctly from the tetraploid Arabicas.

From the foregoing discussion it can be inferred that the genus *Coffea* is of monophyletic origin and draws support from the earlier work (Orozco-Castillo *el al.*, 1996). Also, it can be inferred that the genomic differentiation in *C. arabica* is in a dynamic flux resulting from possible reorganisation/reorientation of DNA at frequent intervals. Thus there is adequate genetic diversity among the host differentials which are drawn from the geographically diverse locations as well as among the land races from the various provinces of Ethiopia, the home land of *C. arabica*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors wish to express their gratefulness to Dr.R.Naidu,Director of Research, CCRI for kind encouragement.

REFERENCES

BERTHOU, .F., MATHIEU, C., VEDEL, F. 1983. Chloroplast and mitochandrial
DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea*L. Theor.Appl.Genet. 65: 77-84

BETTENCOURT, A.J., LOPES, J., PALLA, S.1992. Factores geneticos que a
resistencia as racas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br dos clones tipe dos gruipos 1, 2e 3 de derivados de Hibrido de Timor. Broteria Genetica XIII (LXXX): 185-194

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. 1980. Construction
of a genetic map in man using restriction fragment length ploymorphisms. Amer J.Human Genet.32: 314-331

ESKES, A.B. 1989. Resistance. In Coffee Rust: Epidemology, Resistance and
Management (Eds.A.C. Kushalappa and A.B. Eskes) PP. 171-291. CRC Press, Boca Raton.

LASHERMES, P., COMBES, M.C., CROS.J., TROUSLOT, P., ANTHONY, F.,
CHARRIER, A. 1995. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L.based on DNA molecular markers. Proc. XVI International Scientific Colloquium on Coffee (Kyoto) pp. 528-535.

MULLIS, K. B., FALOONA, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a
polymerase catalysed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350

OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K. J. WAUGH, R., POWELL, W.1994.
Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor.Appl.Genet. 87:934-940.

OROZCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K.J., POWELL, W., WAUGH, R.1996.
RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. Plant Cell Reports 15:337-341

PAILLARD, M., LASHERMES, P., PETIARD, V.1996. Construction of a molecular
linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet. 93: 41-47

RAM, A.S. 1995. New dimensions in understanding inheritance of coffee rust
resistance: A mendelian perspective. Proc. XVI International Scientific Colloquium on coffee (Kyoto). PP 548-553

WEBER, J.L., MAY, P.E. 1989. Abundant class of human DNA Polymorphisms
which can be typed using polymerase chain reaction. Amer.J.Human Genet. 44: 388-396

WELSH, J., Mc CLELLAND, M.1990. Fingerprinting genomes using PCR with
arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY,
S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res.18: 6531-6535.

SETI

SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Define, coordena e executa políticas e diretrizes nas áreas de ciência, tecnologia e ensino superior, num processo de contínuo desenvolvimento, em prol da sociedade paranaense

Fone: 55 (41) 350 1000 www.seti.gov.br

FUNDO PARANÁ

Criado por lei estadual, destina 2% da receita tributária do Estado ao desenvolvimento científico e tecnológico do Paraná

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA

Promove o fomento à pesquisa e capacitação de recursos humanos nas áreas científica e tecnológica do Estado

PARANÁ TECNOLOGIA

Gerencia o Fundo Paraná, visando o desenvolvimento científico e tecnológico do Estado e fomenta a implantação de programas e projetos de desenvolvimento tecnológico industrial

Instituições de Ensino Superior

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA/**UEL** - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ/**UEM** - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA/**UEPG** - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ/**UNIOESTE**/CAMPUS DE CASCAVEL/CAMPUS DE FOZ DO IGUAÇU/CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON/CAMPUS DE TOLEDO - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE/**UNICENTRO**/CAMPUS DE GUARAPUAVA/CAMPUS DE IRATI

FACULDADE DE ARTES DO PARANÁ/**FAP** - ESCOLA DE MÚSICA E BELAS ARTES DO PARANÁ/**EMBAP** - FACULDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS ECONÔMICAS DE APUCARANA/**FECEA** - FACULDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS E LETRAS DE CAMPO MOURÃO/**FECILCAM** - FACULDADE ESTADUAL DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE CORNÉLIO PROCÓPIO/**FAFICOP** - FACULDADE ESTADUAL DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE JACAREZINHO/**FAFIJA** - FACULDADE ESTADUAL DE EDUCAÇÃO FÍSICA DE JACAREZINHO/**FAEFIJA** - FACULDADE ESTADUAL DE DIREITO DO NORTE PIONEIRO DE JACAREZINHO/**FUNDINOPI** - FACULDADE ESTADUAL DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE PARANAGUÁ/**FAFIPAR** - FACULDADE ESTADUAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS E LETRAS DE PARANAVAÍ/**FAFIPA** - FACULDADE ESTADUAL DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE UNIÃO DA VITÓRIA/**FAFIUV**

TECPAR

Atua no desenvolvimento sócio-econômico paranaense com soluções tecnológicas inovadoras e na produção de imunobiológicos

SIMEPAR

Promove a inovação tecnológica do setor energético e da agricultura pela atuação nas áreas das Ciências Atmosféricas e Geociências

GOVERNO DO PARANÁ

PADRÃO MOLECULAR DE CLONES DE CAFEEIRO DIFERENCIADORES DE *Hemileia vastatrix* Berk. et Br.

Terezinha A. Teixeira[1,2], Laércio Zambolim[1,3], Ney S. Sakiyama[1,2], Antônio A. Pereira[4], Dalza G. da Silva[1,3]

[1]BIOAGRO/UFV; [2]DFT/UFV; [3]DFP/UFV; [4]EPAMIG. 36571-000 Viçosa,MG.

Apoio Financeiro: FAPEMIG, FINEP, CNPq, PNP&DCafé

INTRODUÇÃO

A ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), apresenta grande variabilidade, tendo já sido caracterizadas mais de 30 raças fisiológicas, sendo que no Brasil já foram identificadas 12.

O estudo genético do comportamento das progênies de plantas de *Coffea arabica* e dos híbridos, mostrou que a inoculação com raças fisiológicas de *H. vastatrix*, foi possível identificar nove fatores dominantes diferentes, S_H1, S_H2, S_H3, S_H4, S_H5, S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9 condicionando a resistência à *C. arabica*. Os fatores S_H1, S_H2 e S_H5 estão ligados à espécie *C. arabica*, o fator S_H3 é encontrado apenas nos Arábicos originários da Índia e muito provavelmente tenha provindo de *C. liberica* através de hibridação interespecífica. O fator S_H6, provavelmente é oriundo de C. canephora e deve estar associado a um ou mais fatores não identificados que conferem resistência a todas as raças, sendo encontrado no Híbrido de Timor (BETTENCOURT e RODRIGUES, 1988).

Clones de *Coffea* spp têm sido usadas como diferenciadores de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* no programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa. A caracterização molecular desses clones pode facilitar a manutenção da identidade genética, que é indispensável para propósitos de identificação das raças fisiológicas.

Este trabalho foi proposto com o objetivo de caracterizar clones de cafeeiro diferenciadores de *Hemileia vastatrix* e determinar a divergência genética entre eles por meio de marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990).

MATERIAL E MÉTODOS

- **Material genético**

O material genético utilizado encontra-se listado na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista dos 18 clones de cafeeiro diferenciadores de *Hemileia vastatrix*.

Clones	Clones
01. 644/18	10. 87/1
02. 832/1	11. 1006/10
03. 1343/269	12. 635/3
04. 4106	13. 134/4
05. 419/20	14. 110/5
06. 420/10	15. 152/3
07. 147/1	16. 32/1
08. 33/1	17. 128/2
09. 153/2	18. 17/12

- **Extração de DNA**

DNAs dos 18 genótipos foram extraídos de folhas jovens seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro, corrido em gel de agarose 0,8 % e armazenado a 4°C. Na época da amplificação foi diluido em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/µl.

- **Amplificação de DNA e análise eletroforética dos produtos**

Vinte e oito *primers* de 10 bases da "Operon Technologies" foram utilizados para amplificar os DNAs dos 18 genótipos. A amplificação foi feita em termociclador Perkin-elmer 9600 e cada reação contou com um volume total de 25 µl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 unidade AmpliTaq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 µM de *primer* 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl e 2 mM de $MgCl_2$ e o volume final completado com água ultrapura. Foi utilizado o seguinte programa: um ciclo para desnaturação (95°C por 1 min), 39 ciclos para amplificação (15 seg a 94°C, 30 seg a 35°C, 60 seg a 72°C) e para finalizar 7 min a 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram separados em geis de agarose 1,4%, corados com brometo de etídio, visualizados em

UV e fotografados. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas. Somente foram considerados os polimorfismos mais intensos.

- **Análise dos dados**

Foi montada uma matriz de acordo com a presença (1) e ausência de bandas (0). Esta matriz foi usada para calcular as porcentagens de desacordo. O dendrograma foi criado pela análise de clusters do Software STATISTICA usando o método UPGMA ("unweighted pair-group method using arithmetic averages") baseado nas porcentagens de desacordo.

A Figura 1 representa o padrão obtido com o *primer* OPA-01 para os 18 clones diferenciadores de *Hemileia vastatrix* e é apresentado como ilustração.

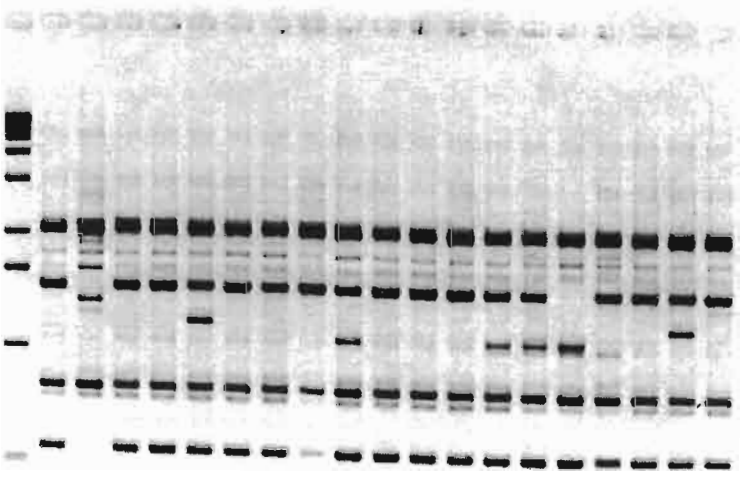


Figura 1 . Padrão de amplificação de DNA obtido com o "primer" OPA-01 para os 18 clones de cafeeiro diferenciadores de *Hemileia vastatrix*. A seqüência partindo da esquerda é a seguinte: DNA marcador de peso molecular, Típica de Portugal, 832/1, 4106, 420/10, 33/1, 87/1, 635/3, 110/5, 32/1, 17/12, 644/18, 1343/269, 419/20, 147/1, 153/2, 1006/10, 134/4, 152/3 e 128/2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As distâncias genéticas expressas em porcentagens de desacordo obtidas para 18 clones de cafeeiro diferenciadores de ferrugem baseadas em 142 marcadores RAPD, variaram entre 6% (entre os clones 17/12 e 128/2 ou 32/1 e 128/2) 71% (entre os clones 1343/269 e 644/18).

A técnica RAPD foi eficiente na caracterização dos clones de cafeeiro diferenciadores de ferrugem, identificando locos polimórficos específicos para cada clone.

Ao nível de 23% de distância genética (Figura 2), sete grupos foram definidos, o grupo A com um clone (644/18 que possui o fator S_H não identificado), o grupo B com um clone (832/1 que possui o fator S_H6 oriundo de *C. canephora*), o grupo C com um clone (1343/269 que possui o fator S_H6 oriundo de *C. canephora*), o grupo D com três clones (4106, 419/20 e 220/10 que possuem os fatores S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9 presentes no Híbrido de Timor), o grupo E com dois clones (147/1 e 33/1 que possuem o fator S_H3 oriundo de *C. liberica*), o grupo F com um clone (153/2 que possui o fator S_H3 oriundo de *C. liberica*) e o grupo G com nove clones (87/1, 1006/10, 635/3, 134/4, 110/5, 152/3, 32/1, 128/2 e 17/12 que correspondem aos genótipos de origem Arábica com os fatores S_H1, S_H2, S_H4 e S_H5). Portanto, 644/18 é o clone mais divergente e a técnica RAPD foi eficiente na caracterização dos clones e agrupamento de acordo com a origem dos fatores de resistência.

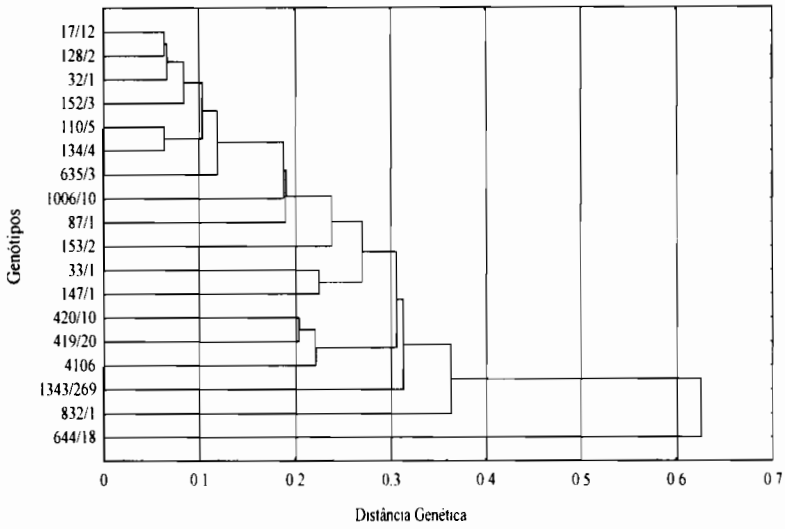


Figura 2 . Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 18 clones de cafeeiro diferenciadores de ferrugem baseadas em 142 marcadores RAPD gerados por 33 *primers*.

BIBLIOGRAFIA

BETTENCOURT, A.J. & RODRIGUES JR., C.J. 1988. Princinples e practice of cofffee breeding for resistance to rust and other disease. In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. (eds). **Coffee**, London, Elsiveir Applied Science. p. 199-235. v.4:Agronomy.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, (1):13-15.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Researchs, 18**(22): 6531-6535.

GENETIC DIVERSITY OF CENICAFE COFFEE GERMPLASM COLLECTION

Marco Cristancho, Hernando Cortina, And German Moreno.

Disciplina de Mejoramiento Genético y Biotecnología, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

ABSTRACT

The genetic diversity of CENICAFE coffee germplasm collection was studied using the RAPD technique. DNA was extracted from semi-wild Ethiopian accessions of Coffea arabica by a modification of the protocols of Vroh et al. (1996) and Mettler (1987). Ten random oligonucleotides (10-mer primers) were used for the amplification of coffee DNA by the RAPD technique. All primers could detect polymorphism between the different coffee introductions tested, showing the ample genetic variability of this material and their potential in coffee breeding programs.

Additionally, three RAPD markers described by Agwanda et al. (1997) and linked to the T gene that confers resistance to the coffee berry disease (CBD) were tested, for their presence in coffee plants of the CENICAFE germplasm collection. It was possible to reproduce easily two of the markers, $M6_{2027}$ and $N18_{250}$ although marker $N18_{250}$ was of a larger size (380bp) than initially reported by Agwanda (250bp). Lately, we have had success reproducing the marker $M20_{830}$ and the primer C03 used for the amplification of this marker also amplified an $M20_{600}$ marker associated to susceptible genotypes. A novelty finding of this study was the discovery that the T gene was introduced into Hibrido de Timor from C. canephora of the type Robusta. This is the first report of a RAPD marker linked to a specific gene to have been introduced into Hibrido de Timor from one of its parents.

We could not find a clear association between these RAPD markers and CBD resistant genotypes. Markers $M6_{2027}$ and $N1_{258}$ were present in several CBD resistant and susceptible individuals of F4 and F5 progenies derived from the cross between Hibrido de Timor plants resistant to CBD and C. arabica cv. Caturra plants susceptible to the disease. In order to have a better understanding of the segregation and ligation of these RAPD markers, they are being transformed into SCAR markers.

INTRODUCTION

Coffee (*Coffea arabica*) semi-wild germplasm has been very poorly studied and just a few field collections of wild coffee germplasm have been overtaken mainly in the 60's, among them FAO and French collection missions.

In CENICAFE a duplicate of the collection of the FAO mission to Ethiopia in 1964-1965 (Meyer, 1968) is currently being studied for its resistance to leaf rust and coffee berry borer. These studies are being also complemented by molecular characterization of the different genotypes tested, trying to find markers linked to important agronomic characteristics. Molecular studies of coffee genotypes with the RAPD technique have confirmed the small genetic variability present in the commercial varieties and the relative high genetic diversity present in semi-wild coffee genotypes (Orozco-Castillo *et* al. 1994; Lashermes *et al.* 1996). Those studies have shown the ample diversity of Ethiopian genotypes that can be exploited by the breeders.

Besides the study of genetic diversity, the RAPD technique has been used in coffee to identify markers linked to resistance genes. Agwanda *et al.* (1997) could detect RAPD markers linked to the *T* gene that confers resistance to CBD. By using a large set of random primers they could identify three markers linked to this resistance gene, named $M6_{2027}$, $M20_{830}$, and $N18_{250}$. The markers could be detected in plants of generations derived from the cross between Hibrido de Timor, the resistant parent, and different susceptible cultivars.

In this research we used the RAPD technique to study the genetic diversity present in semi-wild coffee genotypes of the CENICAFE germplasm collection. Additionally, we investigated the presence of RAPD markers linked to CBD resistance in several progenies derived from the cross between Hibrido de Timor and Caturra.

MATERIALS AND METHODS

DNA Extraction

Coffee DNA was extracted by a protocol adapted at CENICAFE from the methods described by Mettler (1987) and Vroh *et al.* (1996). Young coffee leaves were collected from trees maintained in the field at CENICAFE main research station. The leaves were washed with tap

water, dried and lyophilized. Coffee lyophilized tissue was ground to a powder with liquid nitrogen in the presence of 60mg PVPP, 200mg CTAB, 90 mg DIECA, and 25mg activated charcoal. Pre-heated (60°C) extraction buffer (20mM EDTA; 100mM Tris·HCl pH 8.0; 2M NaCl; 5% 2-mercaptoethanol) was added at a final volume of 7.5ml/0.3g of lyophilized tissue. Organic extraction was performed with a chloroform iso-amyl alcohol (24:1) solution and the DNA precipitated with isopropanol. RNA was eliminated by RNase A treatment.

RAPD Analysis

Ten random 10-mer oligonucleotide primers (GIBCO) were used for the amplification of coffee DNA by the RAPD technique. The list of the primers used is the following: C02 (CTGGGCAACT), C03 (AGGTCTTGGG), C04 (GGTGAGGTCA), C05 (CTTCCGCAGT), C06 (TGCTCTGCCC), C07 (ACTCCTGCGA), C20 (ACTTCGCCAC), P05 (CCCCGGTAAC), ENT06 (CCCAAGGTCC), and CC5 (TGAGTGGGTG). Primers C02, C03 and C04 were also used for the amplification of markers linked to CBD-resistance as described by Agwanda *et al.* (1997).

For the amplification reaction the mix contained 1U DNA Taq polymerase (GIBCO), 1X PCR buffer, 1.8mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTP's, 0.2mg/ml BSA and 15-20ng coffee DNA. The reaction conditions were as follows: 1 cycle at 94°C for 5 min.; 40 cycles at 94°C for 1 min., 36°C for 1 min., and 72°C for 2 min.; and 1 cycle at 72°C for 2 min. The amplification products were separated in 1.5% agarose gels, visualized by Ethidium Bromide staining and analyzed in a Pharmacia Image Master® VDS.

RESULTS AND DISCUSSION

Diversity of Semi-wild *C. arabica* Accessions

The ten random primers used in the study detected some degree of polimorphysm in the genotypes assayed as determined by the presence or absence of at least one band in one of the genotypes. Examples of the variability present in these genotypes are shown in Figures 1 and 2.

We are currently assaying a larger set of primers in order to have a clearer picture of the genetic diversity of the Ethiopian germplasm of the CENICAFE collection. This collection is being tested for its resistance to rust and the coffee berry borer in experiments in the field.

CBD-Resistance Linked Markers

We attempted to reproduce the three RAPD markers described by Agwanda *et al.* (1997) as linked to CBD resistance. We were successful in reproducing markers $M6_{2027}$, and $N18_{250}$ (Figures 3 and 4), and recently we could also reproduce marker $M20_{830}$, which we could not amplify as easily as the other two markers. Curiously with primer C03 used to amplify marker $M20_{830}$ associated to resistant genotypes, we also amplified a marker linked to susceptible genotypes (data not shown). This marker had a size of approximately 600bp (designated as $M20_{600}$) and was not identified by Agwanda with primer C03.

Marker $M6_{2027}$ was amplified in several Hibrido de Timor trees, but it was not amplified in others. All these trees originated from accession CIFC-1343. This suggests that this accession was heterozygous for the *T* gene (Figure 3). This marker was also amplified in the accession BGB138 of *C. canephora* of the type Robusta (Lane 13), but not in the accession 73 of the type Conilon (Lane 14). The band amplified in the same size region in *C. kapakata* (Lane 15) is of a smaller size than the marker of 2027bp. Marker $N18_{250}$ showed in our experiments a size of 380bp, larger than the 250bp size reported by Agwanda (Figure 4). We do not know the reason for this difference in size between the two labs.

All these markers are currently being transformed at CENICAFE into SCAR markers in order to have a more reproducible test and improve the selection of CBD-resistance genotypes.

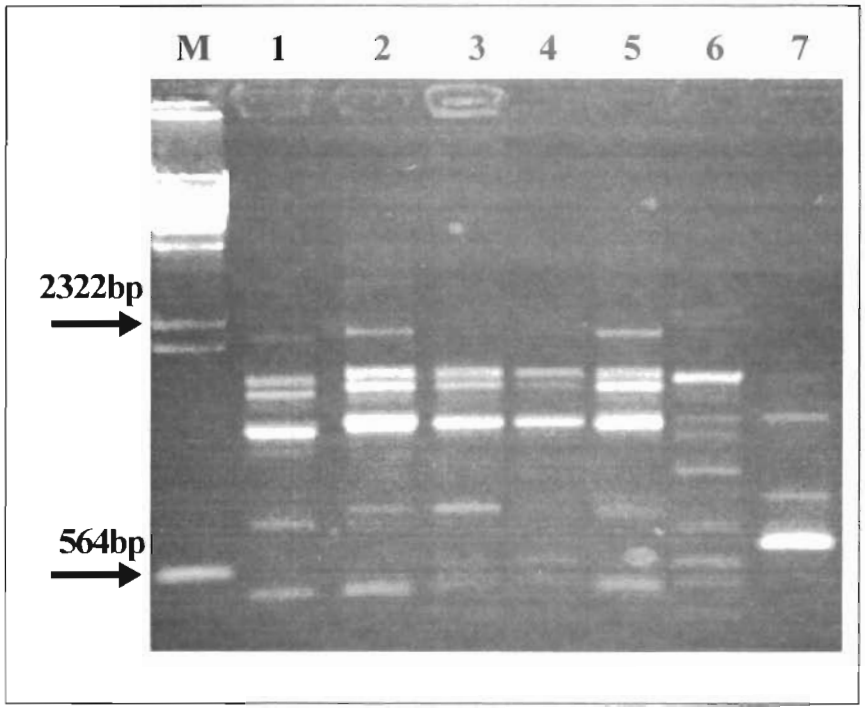


FIGURE 1.- Amplification profile obtained with primer C07 in semi-wild genotypes of *C. arabica* from Ethiopia and other coffee species. LANES: **1.** *C. arabica* E-20 **2.** *C. arabica* E-59 **3.** *C. arabica* E-143 **4.** *C. arabica* E-334 **5.** *C. arabica* var. San Bernardo **6.** *C. canephora* 73 **7.** *C. liberica* **M** = Lambda *Hin*dIII fragments

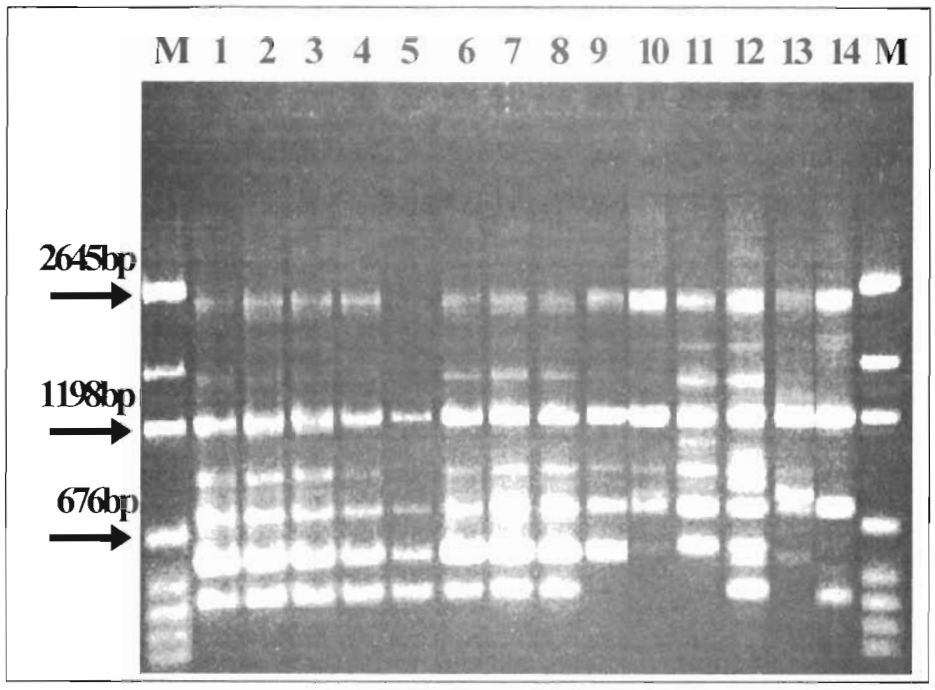


FIGURE 2.- Amplification profile obtained with primer C06 in semi-wild genotypes of *C. arabica* from Ethiopia, commercial varieties and other coffee species. LANES: **1.** *C. arabica* E-20 **2.** E-59 **3.** E-143 **4.** E-167 **5.** E-298 **6.** *C. arabica* BA36 **7.** *C. arabica* var. Rume Sudan **8.** *C. arabica* var. Rume Sudan **9.** Hibrido de Timor **10.** *C. canephora* var. Conilon **11.** *C. canephora* BGB138 **12.** *C. canephora* 73 **13.** *C. liberica* **14.** *C. kapakata* **M**= pGEM Markers

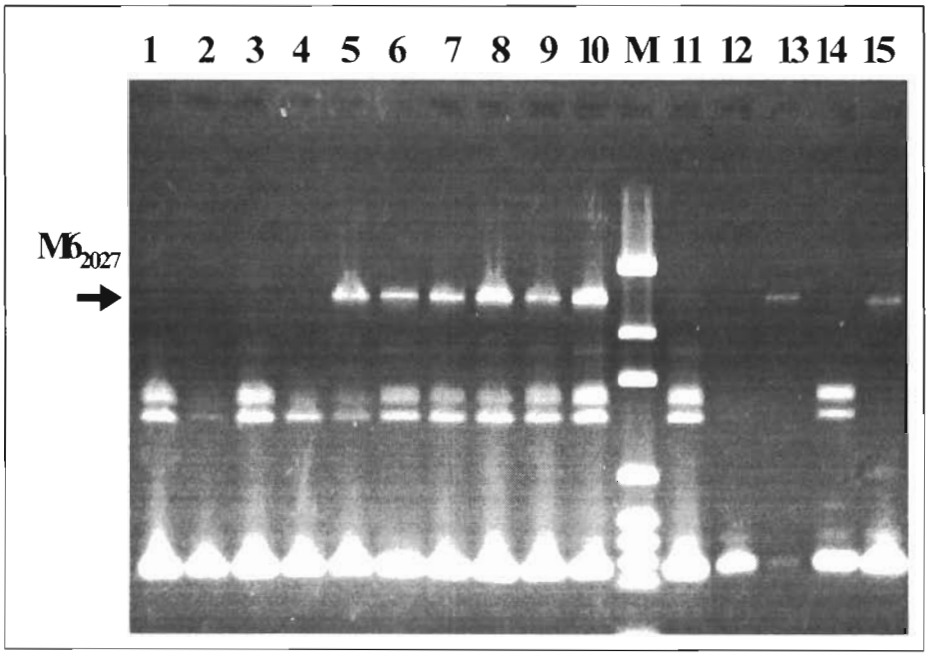


FIGURE 3.- Amplification of marker $M6_{2027}$ with primer C02 in several Híbrido de Timor trees, HdtxCat. crosses and a *C. canephora* accession. LANES: **1**. Híbrido de Timor 1102 **2**. HdT 1103 **3**. HdT 1105 **4**. HdT 1106 **5**. HdT CV1 **6**. HdT CV2 **7**. HdT CV3 **8**. HdT CV4 **9**. HdTxCat Cx2432 **10**. HdTxCat Cx2124 **11**. *C. arabica* cv. Caturra **12**. *C. arabica* var. Rume Sudan **13**. *C. canephora* BGB-138 **14**. *C. eugenioides* **15**. *C. kapakata* **M** = pGEM Markers

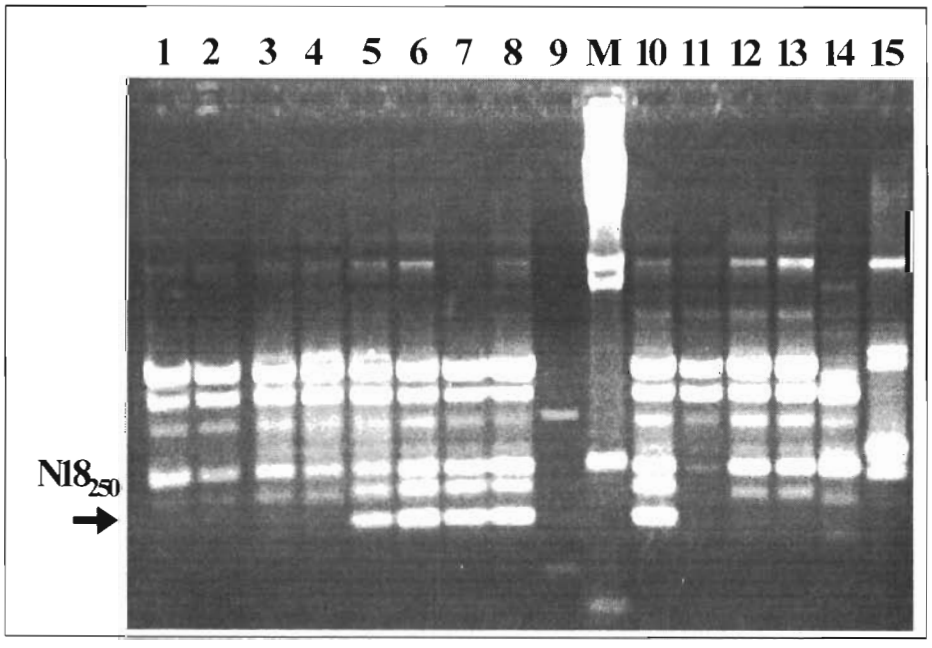


FIGURE 4.- Amplification of marker $N18_{250}$ in Hibrido de Timor trees and a HdTxCat. cross. LANES: **1**. Hibrido de Timor 1102 **2**. HdT 1103 **3**. HdT 1105 **4**. HdT 1106 **5**. HdT CV1 **6**. HdT CV2 **7**. HdT CV3 **8**. HdT CV4 **9**. HdTxCat. 1903 **10**. HdTxCat. Cx2432 **11**. *C. arabica* cv. Caturra **12**. *C. arabica* E-20 **13**. *C. arabica* E-59 **14**. *C. eugenioides* **15**. *C. kapakata* **M** = Lambda *Hin*dIII fragments.

CONCLUSION

The initial screening of *C. arabica* Ethiopian accessions of the CENICAFE collection by the RAPD technique showed that there is a high genetic diversity in these semi-wild genotypes. We are currently using a larger set of random primers to complete the molecular study of the Ethiopian collection present at CENICAFE. As expected, *C. arabica* commercial varieties seem to have a smaller diversity than the semi-wild genotypes.

We demonstrated in this study that the genes responsible for CBD resistance (at least the gene *T*) in Hibrido de Timor were introduced in this hybrid from *C. canephora*, one of its parents (Moreno 1989; Lashermes *et al.* 1993). RAPD fragments present in *C. arabica* genotypes and introduced from *C. canephora* had already been identified by Lashermes *et al.* (1993) and Orozco-Castillo *et al.* (1994). However, this is the first study in that a RAPD fragment introduced from *C. canephora* and linked to a specific gene has been identified in *C. arabica*.

It was not possible to establish a clear association between the $M6_{2027}$ and $N18_{250}$ markers and CBD resistant genotypes since they were amplified in resistant and susceptible F4 generation plants derived from the cross between Hibrido de Timor and Caturra (data not shown). We have not used yet the $M20_{830}$ marker and the new identified $M20_{600}$ marker to establish their association to CBD-resistant and susceptible genotypes in advanced generations of Hibrido de Timor x Caturra crosses.

In order to have a better understanding of the segregation and ligation of these RAPD markers, they are being transformed into SCAR markers. These markers should work as an improved system for the pre-selection of CBD-resistant individuals that are sent to laboratory tests in Portugal. They can additionally be used as RFLP markers.

REFERENCES

Agwanda, C.O., P. Lashermes, P. Trouslot, M.C. Combes, and A. Charrier. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. Euphytica 97:241-248.

Lashermes, P., J. Cros, P. Marmey, and A. Charrier. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. Genet. Res. Crop Evol. 40:91-99.

Lashermes, P., P. Trouslot, F. Anthony, M.C. Combes, and A. Charrier. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87:59-64.

Mettler, I.J. 1987. A simple and rapid method for minipreparation of DNA from tissue cultured plant cells. Plant Mol. Biol. Rep. 5:346-349.

Moreno, G. 1989. Etude du polymorphisme de l'Hybride de Timor en vue de l'amelioriation du cafeier arabica: variabilité enzymatique et agronomique dans les populations dórigine; résistance incomplète à *Hemileia vastatrix* dans les croisements avec *Coffea arabica*. Montpellier. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 153p. (These Doctor-Ingenieur).

Orozco-Castillo, C., K.J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87:934-940.

Vroh, I., L. Harvengt, A. Chandelier, G. Mergeai, and Du Jardin. 1996. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding 115:205-206.

GENETIC ANALYSIS OF BRAZILIAN STRAINS OF *Xylella fastidiosa* ASSOCIATED WITH CITRUS AND COFFEE

Rui. P. Leite Jr.[1,3], Angela Mehta[1,3], Flávia. M. S. Carvalho[1,4] and Bernardo Ueno[2]

[1] Instituto Agronômico do Paraná, C.P. 481, 86001-470, Londrina, PR, Brazil
[2] Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil
[3] Fellow of the CNPq
[4] Fellow of the CNP & D/CAFÉ

INTRODUCTION

Xylella fastidiosa Wells *et al.* (1987) causes diseases of economic importance in several cultivated plants. In Brazil, strains of *X. fastidiosa* have been associated with citrus variegated chlorosis (CVC) on sweet oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and a dieback and leaf scorch type of disease on coffee (Coffea spp.). CVC is a major threat to the brazilian citrus industry, whereas *X. fastidiosa* is wide spread on coffee trees in all major coffee growing areas.

Although some studies have yielded a level of understanding of the variability among strains of the bacterium, *X. fastidiosa* strains associated with citrus and coffee trees have yet to be compared on the basis of DNA analysis. By using restriction endonuclease of infrequently occurring recognition sites, we carried out a genomic analysis of citrus and coffee strains of *X. fastidiosa*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Citrus and coffee strains of *X. fastidiosa* were obtained from a reference collection at Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, Brazil (Table 1). All strains have been identified previously as members of *X. fastidiosa* by DAS-ELISA (R. P. Leite Jr., personal information). Bacterial cells were obtained from cultures on PW or BCYE media.

Pulsed field gel electrophoresis

The method of DNA preparation was described previously by COOKSEY & GRAHAM (1989) and EGEL *et al.* (1991) with minor modifications. Total genomic DNA was digested in the agarose blocks with the restriction endonucleases *Not*I or *Sfi*I. The gel was placed in a GENE NAVIGATOR (Pharmacia, Upssala, Sweden) unit containing TBE and run at 185 volts. Pulse times for DNA restricted with *Not*I were 4 s for 1 hr and 10 s for 18 hrs and for DNA restricted with *Sfi*I pulse times were 3 s for 1 hr and 10 s for 18 hrs.

Data analysis

Genetic similarity between strains was calculated by using the equation proposed by Nei & Li (1979), F=2nxy/(nx+ny), where nxy is the number of fragments shared between two strains and nx and ny are the total number of fragments of each strain. Relationships among strains were studied by phylogenetic analysis with the BOOT program from the PHYLIP computer package (Felsenstein, 1991).

Table 1. List of strains of *Xylella fastidiosa* used in this study.

Strain	Isolation Date	Origin	Host
8935	----	ATCC 35879	Grape
9712	07/90	Macaubal, SP	Citrus
10414	07/92	Itajobi, SP	Citrus
10437	04/93	Itajobi, SP	Citrus
10438	05/93	Loanda, PR	Citrus
11037	03/95	Bebedouro, SP	Citrus
11066	03/95	Londrina, PR	Citrus
11067	03/95	Londrina, PR	Citrus
11347	05/95	Loanda, PR	Citrus
11348	05/95	S Pedro do PR, PR	Citrus
11380	08/95	Pinhalzinho, SC	Citrus
1399	11/95	Boquim, SE	Citrus
11400	11/95	Boquim, SE	Citrus
11752	----	Fundecitrus	Coffee
11775	03/96	Tuparandi, RS	Citrus
11779	03/96	Descanso, SC	Citrus
11780	03/96	Tuparandi, RS	Citrus
11782	04/96	Londrina, PR	Coffee
11834	03/97	S Pedro do PR, PR	Citrus
12290	08/97	Londrina, PR	Citrus
12291	10/97	Cunha Porã, SC	Citrus
12296	----	IB (CT5640)	Citrus
12297	----	IB (CT5640)	Citrus
12298	----	Fundecitrus (D5)	Citrus
12299	----	Fundecitrus (C4)	Citrus
12300	----	Fundecitrus (C3)	Citrus
12307	----	Genome Project[a]	Citrus

[a]Strain of *X. fastidiosa* used in the Genome Project of FAPESP (São Paulo, SP, Brazil).

RESULTS

Genomic DNA of the citrus strains of *X. fastidiosa* associated with CVC when restricted with either *Not*I or *Sfi*I endonucleases produced diverse restriction patterns (Fig. 1). In comparison to the strain 8935 of grapevine (ATCC 35879), the citrus strains had few comigrating DNA fragments. In contrast, the citrus strains had restriction patterns with several comigrating DNA fragments with the coffee strains 11752 and 11782 (Fig. 1). The genetic similarity estimated from the restriction data obtained with the combination of the two restriction endonucleases ranged from 0.77 to 1.00 among the citrus strains (Table 2). In comparison to the grapevine and the coffee strains, the genetic similarity ranged from 0.31 to 0.45 and 0.69 to 0.84, respectively (Table 2). The phylogentic tree reconstructed based on the restriction fragment data showed three major clades with the grapevine and the coffee strains as the sole members of two clades (Fig. 2). The clade comprising the citrus strains can be subdivided in two subclades with one formed with the strains from the states of São Paulo and Sergipe, and the other with strains from Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul states (Fig. 2).

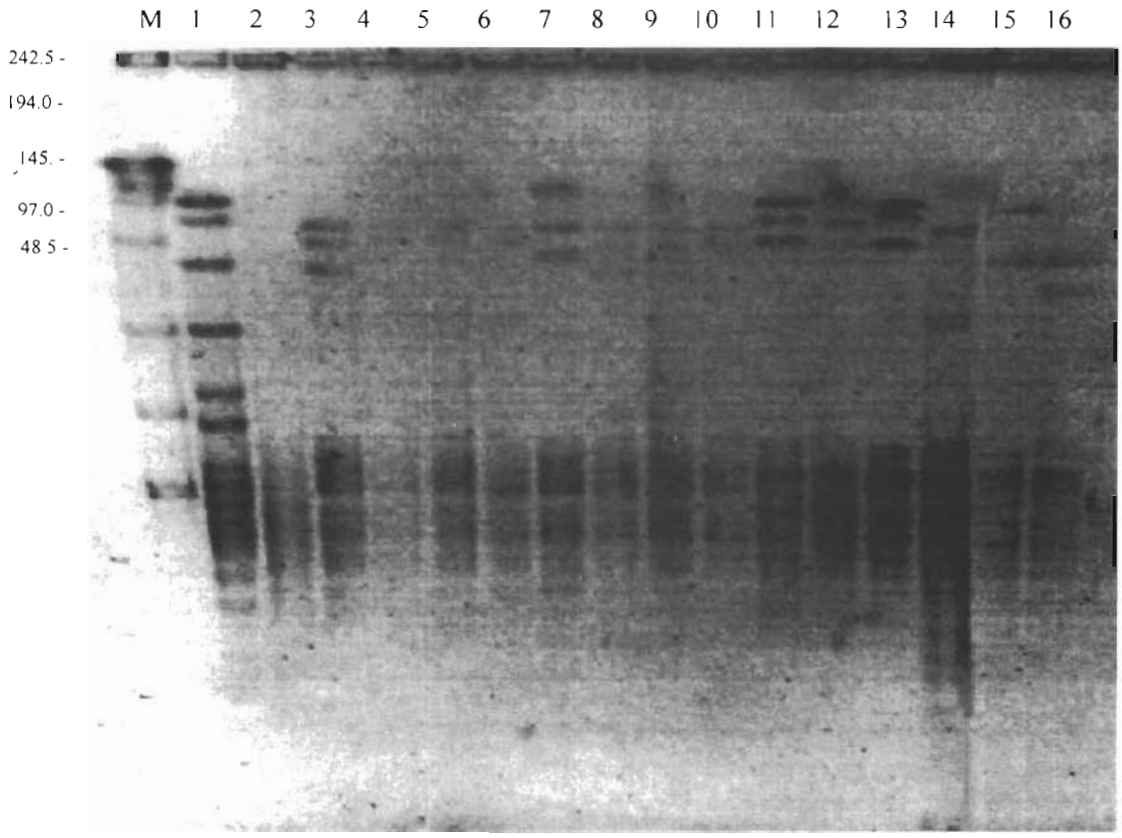


Fig. 1. Restriction endonuclease patterns of strains of *X. fastidiosa* restricted with *Sfi*I. Lanes: M, Lambda marker; 1, 8935; 2, 11037; 3, 10437; 4, 10414; 5, 12300; 6, 12299; 7, 12298; 8, 12296; 9, 12297; 10, 12290; 11, 11779; 12, 12291; 13, 11067; 14, 9712; 15, 11752; 16, 11782. Molecular sizes are given in kilobases.

Table 2. Genetic similarity matrix for strains of *X. fastidiosa* based on restriction endonucleose analysis of genomic DNA fragments separated by pulsed field gel electrophoresis.

Strain	**Citrus**									**Coffee**	**Grape**
	10437	10414	12300	12299	12296	12297	12290	11779	12291	11752	8935
10437	-	0.87	0.87	0.90	0.97	0.94	0.93	0.77	0.77	0.69	0.31
10414		-	0.93	0.93	0.90	0.87	0.93	0.83	0.83	0.73	0.33
12300			-	0.96	0.90	0.87	0.93	0.90	0.90	0.73	0.32
12299				-	0.93	0.90	0.96	0.86	0.86	0.76	0.34
12296					-	0.98	0.90	0.80	0.80	0.71	0.32
12297						-	0.87	0.77	0.77	0.69	0.31
12290							-	0.83	0.83	0.73	0.33
11779								-	1.00	0.84	0.45
12291									-	0.84	0.45
11752										-	0.50
8935											-

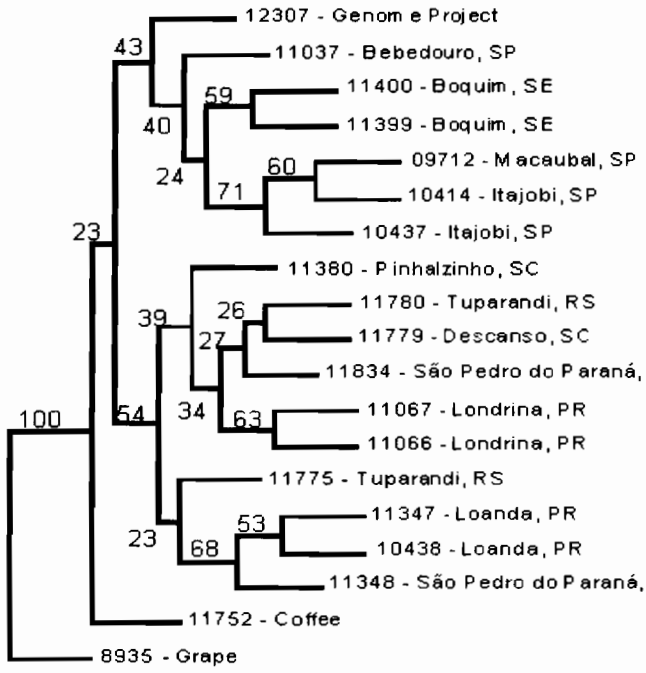


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree for strains of *X. fastidiosa* inferred from restriction analysis of DNA fragments, generated by the BOOT program from the PHYLIP computer package. Numbers in each node indicate the bootstrap percentages.

DISCUSSION

The results obtained in this work demonstrated that strains of *X. fastidiosa* associated with citrus are genetically diverse. The phylogenetic analysis suggested a grouping based on geographic origin of the strains. Strains of the bacterium from states of São Paulo and Sergipe are closely related while strains from Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul states form another clade. Further, the coffee strains of *X. fastidiosa* are genetically closely related to the citrus
strains. In contrast, the citrus and coffee strains are not closely related to the grapevine strain on the basis of restriction analysis of DNA fragments. The genetic relationships and diversity of *X. fastidiosa* obtained from citrus and coffee suggest that the bacterium is endemic to Brazil. Furthermore, the relatedness of the citrus and coffee strains of *X. fastidiosa* also indicates that those strains may have a common genetic background.

REFERENCES

Cooksey, D.A., and J.H. Graham. 1989. Genomic fingerprinting of two pathovars of phytopathogenic bacteria by rare-cutting restriction enzymes and field inversion electrophoresis. Phytopathology, 79:745-750.

Egel, D.S., J.H. Graham and R.E. Stall. 1991. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. Appl. Environ. Microbiol., 57:2724-2730.

Felsenstein, J. 1991. PHYLIP, Phylogeny Inference Package, version 3.4. Departament of Genetic, University of Washington, Seattle.

Nei , M. and W. Li . 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:5269-5273.

Wells, J.M., B.C. Raju., H. Hung., W.G. Weisburg., L. Mandelco-Paul and D.J. Brenner. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp; nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. J. Syst. Bacteriol., 37: 136-143.

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR STUDIES OF THE MAIN PROTEIN IN THE COFFEE ENDOSPERM

Ricardo Acuña[1], Ronald Bassüner[3], Vadim Beilinson[3], Hernando Cortina[1], Gabriel Cadena-Gómez[1], Virginia Montes[2] and Niels Nielsen[3].

[1]Centro Nacional de Investigaciones del Café, Chinchiná,Caldas, Colombia.
[2]Departamento de Quimica, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia
[3]United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service and the Departments of Agronomy and Biochemistry, Purdue Univbersity, West Lafayette, IN 47907, USA.

INTRODUCTION

Coffee bean, the raw material from which all coffee producs originate, is derived from the seeds of *Coffea* spp. Despite the inmense economic importance of coffee bean, little is known about the biochemical and molecular properties of its seed proteins. Only values for the protein content of coffee beans have been reported in the range od 8.7-12.2% (Macrae, 1985). Work has focused on the characterization of water soluble proteins in different coffee varieties (Centi-Grossi et. al. 1969; Amorim et. al. 1975) or coffee beans processed by different methods (Underwood and Deatherage, 1952).The information provided in these reports describes molecular mass profiles and protein content. Nothing is known about the structure of genes that encode the proteins, the identity of the primary gene products, or the regulation of their expression.
This work describes the identification of a legumin-like seed storage proteins of the 11S size class (Nielsen et. al. 1997) in coffee. Two cDNAs that encode the proteins are described, a promoter for an 11S gene is showed, and the subcellular localization of the protein in the seed endosperm is documented.

MATERIALS AND METHODS

Coffee endosperm were harvested about 150 and 220 days after flowering, and stored at -80°C until use. For immunocytochemistry, the endosperm was harvested about 220 days after flowering and fixed with 3% glutaraldehyde in phosphate buffer.Extraction and fractionation of total seed protein was made from frozen immature or mature coffee seeds.

Sequential fractionation of coffee seed proteins: seed proteins were extracted sequentially from mature coffee endosperm in "albumin extraction buffer"; pH 4.5, (Sluyterman and Wijdens 1970), phosphate buffer ("Globulin extraction buffer") and the residue remaining was extracted a with 70% absolute ethanol and 10 mM DTT and was considered to be the "Prolamine Fraction". Total coffee seed proteins were fractionated in a sucrose gradient 6 to 22%) and samples from each fraction, were analyzed by electrophoresis.

N-terminal sequence analysis.Endosperm protein samples were electroblotted and the legumin-like cofffee protein was cut from the stained blot membrane and processed in a model A491 protein sequencer.

Extraction and purification of mRNA from immature coffee endosperm: Total RNA was isolated, as described by Schultz (1994) for recalcitrant plant tissues, from frozen inmature coffee endosperm. To prove translatability of the isolated mRNA, an in vitro mRNA cell-free translation was carried out in a reticulocyte lysate.

cDNA cloning: Synthesis of full-length cDNA was made using the TimeSaver™ cDNA Synthesis Kit (Pharmacia). An *Eco*R I/*Not* I adaptor was ligated to the ends of the resulting fragments. A sense oligonucleotide primer was synthesized on the basis of the N-terminal amino acid sequence determined for the alpha chain of the coffee legumin. A second antisense-degenerate oligonucleotide was synthesized based on N-terminal amino acid sequence determined for the beta. These primers were used to amplify nearly the entire acidic legumin chain. The PCR fragment was cloned into a pCRII vector and both strands were sequenced using an ALF automated DNA sequencer. Based on the nucleotide sequence that was obtained, two additional oligonucleotide primers were synthesized and used in combination with a short specific primers designed on the basis of the EcoR I/Not I adaptor sequence. These were used to amplify the basic chain cDNA and the N-terminal signal peptide, respectively. The overlapping sequences that were obtained were aligned to yield a full-length cDNA sequence.

DNA blot hybridization. Coffee genomic DNA was digested with various restriction enzymes and

the restriction fragments were separated in agarose gels. A vacuum blotting system was used to transfer the DNA fragments from the gel to a membrane using an alkaline vacuum transfer protocol. An EcoR1 DNA fragment (~900 bp) that corresponed to the acidic chain of coffee legumin was purified by agarose gel electrophoresis and labeled and used for hibridization.

Electron microscopy immunocytochemistry. Plant material was cut into small blocks of about 1 mm length and immediately fixed in 0.1M phosphate buffer, pH 7.3, containing 3% glutaraldehyde. Embedding was performed in LR White and in Epon resins. The sections were prehybridized in blocking solution, followed by hybridization with purified antibodies against coffee 11S proteins. Hybridization took place for several hours on a rocking platform. After washing in TBST, the grids were incubated with anti-rabbit IgG-gold conjugate diluted 15-fold into a blocking solution. This was followed by washes in TBST and water. As a final step, the grids were incubated for two minutes in 1% glutaraldehyde, followed by a rinse with water. To enhance contrast, the sections were treated in a LKB 2168 UltraStainer with a saturated solution of uranyl acetate, pH 4.0, for 20 min at 26°C, and this was followed by incubation for 2 minutes at 20°C with 83mM lead acetate, pH 12. Finally, the thin sections were carbon coated in a vacuum evaporator (Ladd Research Industries). Inspections under the electron microscope (JEM 100 CX, Joel, Japan) were carried out at 80kV.

RESULTS

A legumin-like seed protein was purified from the endosperm of coffee (*Coffea arabica* L. cv. Colombia). In contrast to legumes, where efficient storage globulin extraction requires buffered saline slolutions well above the acidic pK_I of the globulins, coffee legumin is readly extracted with acidic aqueous buffers.. Subunits of coffee legumin have a M_r of about 55 kDA after one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis in the absence of a reducing agent. In the presence of 2-mercaptoethanol, two polypeptides appear that have apparent molecular masses of 33 and 24 kDa (Figure 1). The coffee legumin migrates like other 11S storage globulins in sucrose gradients (Figure 2). Two full-length cDNAs were generated from mRNA of developing seeds that were more than 98% homologous (Figure 3). They had open reading frames of 1458 and 1467 bp. Each encoded legumin precursors of 486 and 489 amino acids, respectively ($(M_r$= 54136 and 54818). Examination of a 5' promoter region from a coffee legumin gene revealed a putative legumin-box (figure 4). Genomic DNA from *C. arabica* was digested with six different restriction endonucleases. After separation of the fragments by electrophoresis, single discrete fragments on DNA blots hybridized strongly to a cDNA probe for the acidic chain (Figure 5). DNA from other species and commercially important cultivars that comprise the genus *Coffea* produced similar results (Figure 6). Immunocytochemical studies revealed that some legumin was detected in the cytolasm in mature coffee seeds, but that the majority of it was in large storage vacuoles that accounted for most of the cell volume (Figure 7).

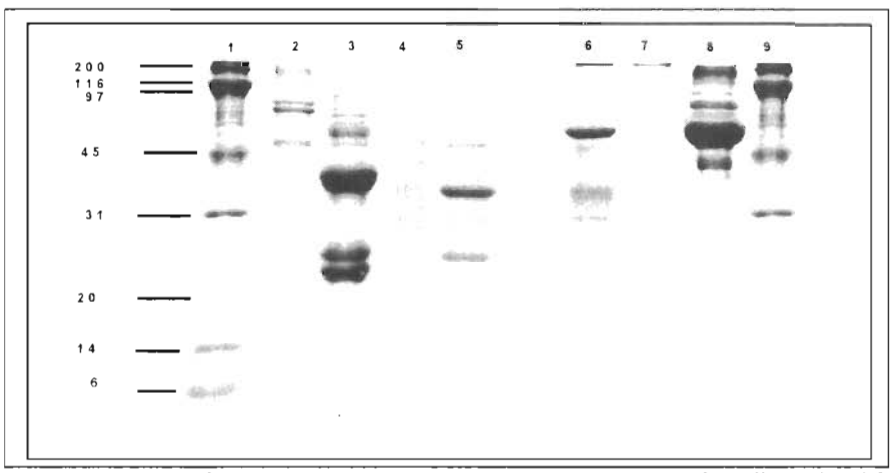


Fig. 1. Proteins extracted from mature and immature coffee endosperm. One-dimensional SDS-PAGE separation of seed proteins extracted in SDS buffer in presence (lanes 2-5) or absence (lanes 6-8) of 2-ME. Numbers in the right margin refer to molecular mass in kDa of protein standards. Lanes 1 and 9 size markers, lane 2 soybean conglycinin, lanes 3 and 8 total seed protein from faba bean, lanes 4 and 7 immature coffee seed proeins extracted, lanes 5 and 6 total seed proteins from coffee.

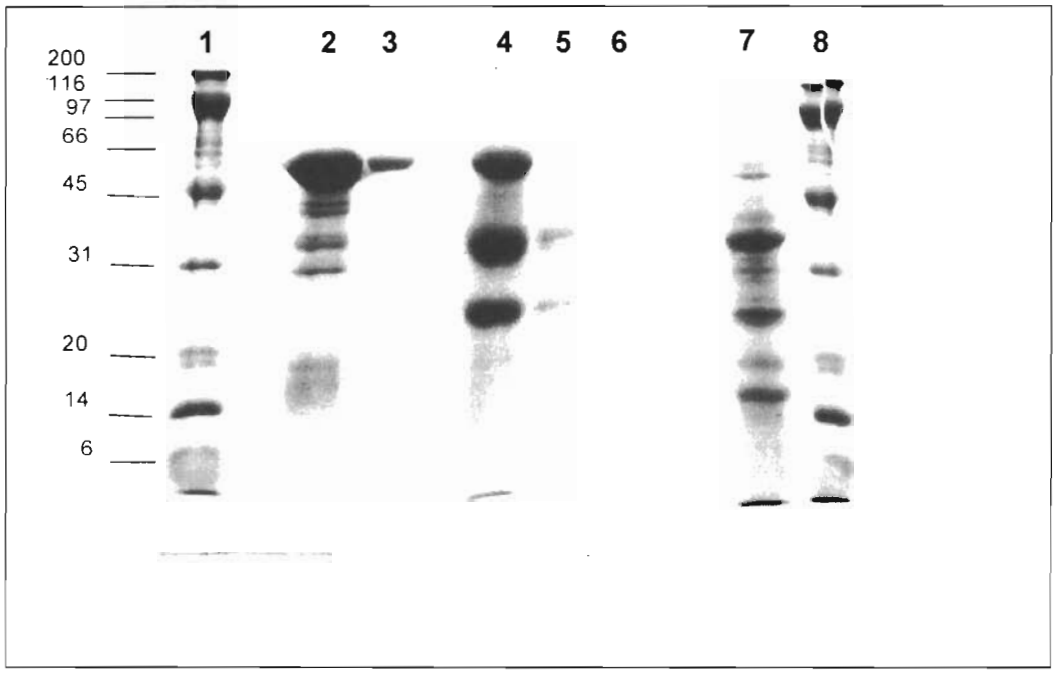


Fig. 2. Differential extraction of coffee seed proteins. One-dimensional electrophoretic separation of coffee seed proteins extracted sequentially with albumin, globulin, prolamin, and SDS buffers. Numbers in the right margin refer to the position and molecular mass in kDa of protein standards Lanes 1 ans 8 size markers, lanes 2 and 4 albumin fraction, lanes 3 and 5 globulin fraction, lane 6 prolamin fraction, lane 7 SDS fraction, lane 9 total coffee seed proteins extracted directly with SDS sample buffer. The samples in lanes 2 ans 3 contained no 2-ME, while those in lanes 4-9 contained 2-ME.

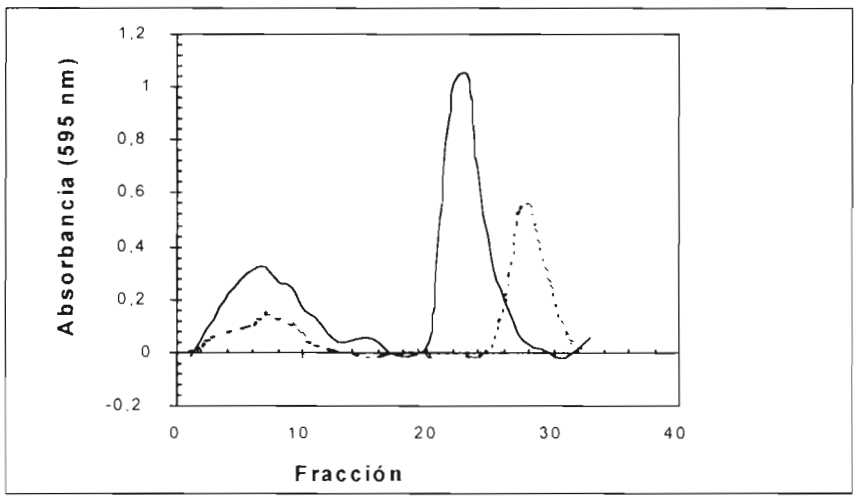


Fig 3. Sedimentation properties of proteins extracted from coffee endosperm.Proteins from the albumin fraction of coffee were separated in gradients of 6-22% sucrose at low (no added salt, dashed line) or high ionic strength (0.4 M KCl, solid line) buffer. Two prominent peak regions are observed with coffee samples around fractios 9 and 27 for sambples from gradients that contained no added salt. The latter peak shifted to a lower apparent density (fraction 23) in sucrose gradients that contained 0.4 M NaCl. Fraction 1 is from the top of the gradient and raction 33 is from the bottom.

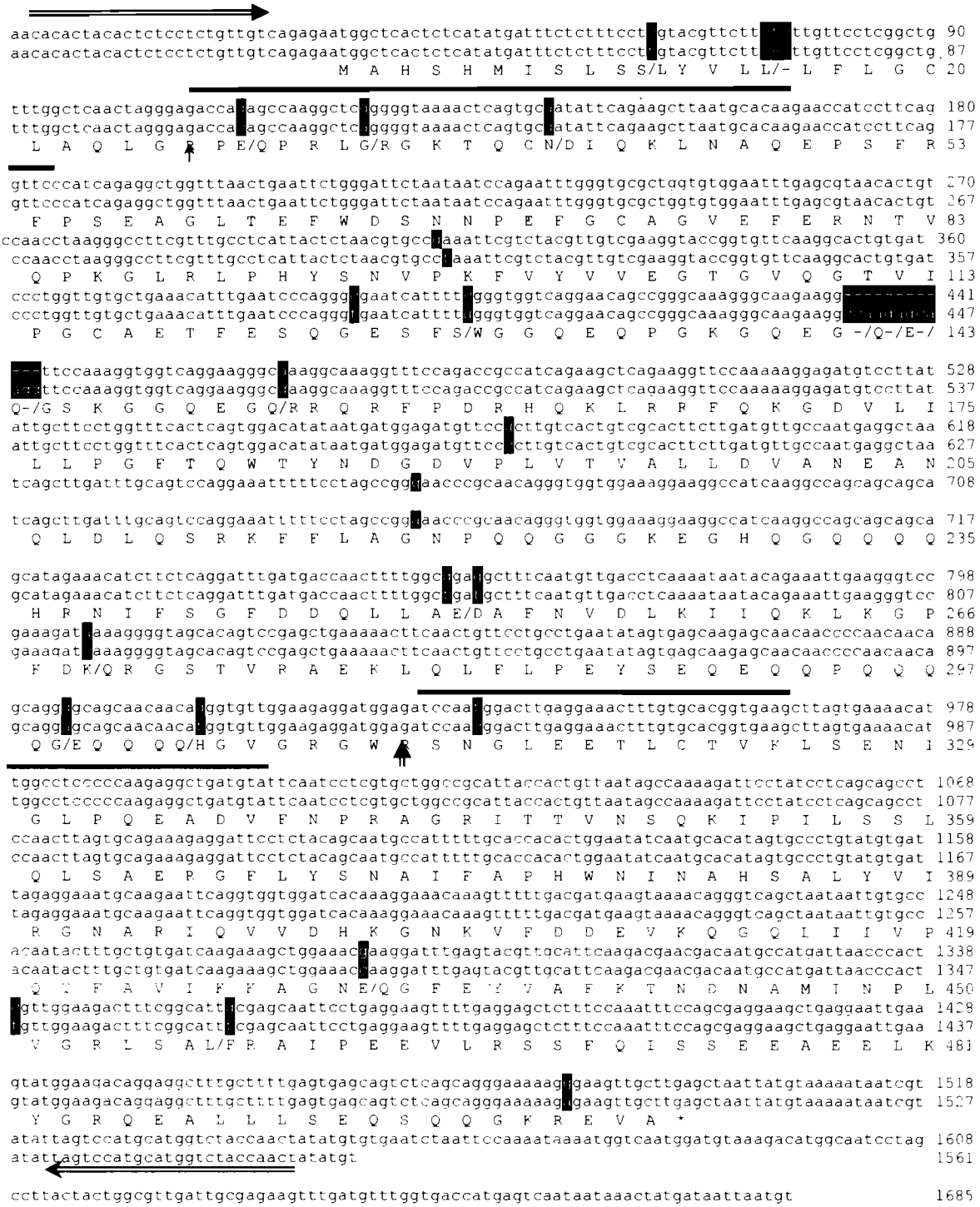


Fig. 4. **The cDNA nucleotide sequence for two coffee legumins and their deduced amino acid sequences**. The N-terminal amino acid sequences for acidic and basic chains that were determines chemically are shown by solid horizontal lines above the sequences. Clone pCA4 includes bases 127-1023. pCA3 extends from 5′ linker to base 216, and clone pCA9 extends from base 208 to the 3′linker. The oligonucleotides denoted by the left and right facing open arrows permitted full coding regions of coffee legumin to be amplified. Differences between the nucleotide coding regions are indicated in reverse type, and the deduced amino acid sequences are provided above the nucleotide sequences. The single vertical arrow (↓) indicates the position where the signal peptide is cleaved from the prolegumin while the short, double vertical arrow (⇓) identifies where post-translational modification takes places to form the acidic and basic chains of mature subunits. Upper sequences corresponds to accession number U64443 and the lower sequence to AF054895.

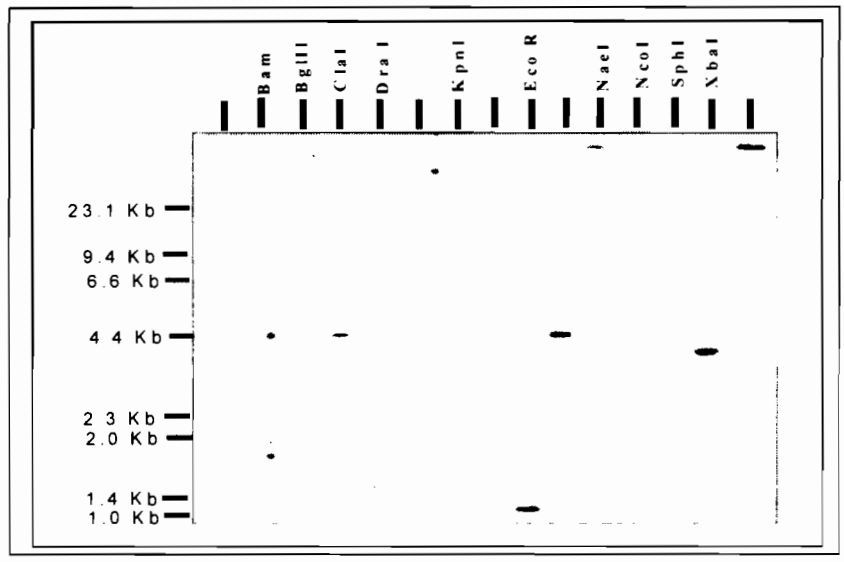


Fig. 5. Genomic DNA blot analysis of then different species and cultivars from the *Coffea* family. Genomic DNA blot analysis of ten differnt species and cultivars from Coffea family. Genomic DNA was digested with three restriction endonucleases (A Xba1, B Eco RV, C Eco R1). DNA fragments after this treatment were separated in a 0.8% agarose gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with the DNA insert from pCA4 at high stringency. The insert corresponds to the mature acidic chain and N-terminal of the basic chain. Species 1, Hibrido de Timor; species 2, *C. eugenoides*; species 3 *C. liberica*; pecies 4 *C. kapakata*; species 5, *C. arabica* cv. Caturra; species 6, *C. canephora* cv. Conilon; species 7, *C. canephora* cv. Robusta; species 8 *C. arabica* x *C. canephora*; species 9, *C. arabica*; species 10, *C. arabica* cv. Colombia

```
-361  caagatgaatgtgtgtttgatttggggtttgattcatcaaaagccatcgtagcagataatgcaccttaccatgccattgc

-281  taaagtacaaaaatttcatgcaaatacaaacacaaaaggattgaacaatacatgtcagaaactcattgccaccaaggctt
                          ttccatagc--catgcatgctgaagaatgtct*
-201  acacatcatccttggtgtaaagaagttttcctcttcatcagccatgcacaagactgagtagccaagtgtaaaatgaaaat

-121  tttgacgtgtcgattcctcatcttccaattacatgttataaaaggagccatttccaagctctaatcgccgcatcccctca

 -41  ccacaaaaacacactacactctcctctgttgtcagagatg
```

Fig 6. Nucleotide sequence of the promoter for a coffee legumin gene. The first 400 bp of DNA upstream from the beginning of the coding region for a coffee legumin gene is shown. A putative legumin box is compared with a consensus sequence derived from legume genes. Homology is indicated for a nucleotide identified by reverse printing. Central to the legumin box is a degenerate CATGCAT element (underlined). As it is typical of corresponding genes from legumes, other CATGCAT elements are present in the upstream region. A TATA box element (double underlined) is also present.

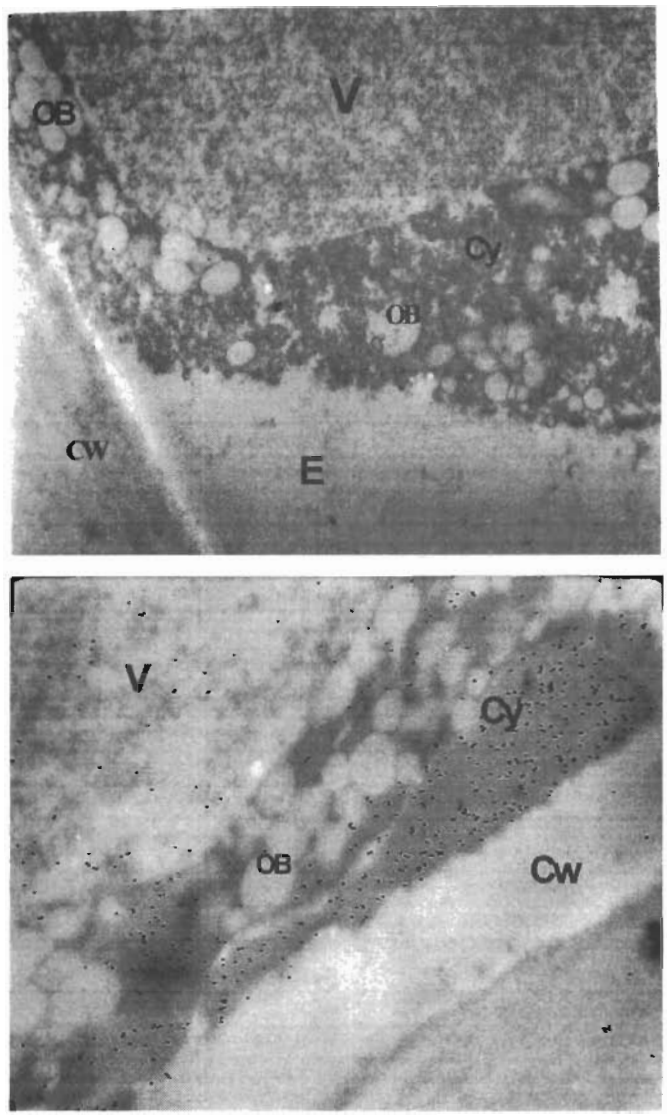


Fig 7. Immunolocalization of coffee legumin. A) Low magnification electron micrograph of a typical coffee endosperm cell at about 220 DAF. The cells contain a large central storage vacuola surrounded by cytoplasm. Contained within the cytoplasm are many small, electron-transparent vacuoles, presumably oil bodies. (B) High magnification electron micrograph showing immunolocalization of coffee legumin. Gold laceled antibody against coffee legumin were reacted with thin sections of coffee endosperm. CW: cell wall; Cyt: cytoplasm; V: Storage vacuole; OB: oil body.

REFERENCES

Centi-Grossi M, Tassi-Mico C., Silano, V. 1969. Albumin fractionation og green seed varieties by acrilamide gel-electrophoresis. Phytochemistry 8:1749-1751.

Macrae, R. 1985. Nitrogenous components. In: Clarke RJ. Macrae (Eds). Coffee, vol 1:Chemistry. Elsevier Applied Science Publishers, New York, NY, pp 115-152

Nielsen, N.C., Bassüner, R., Beaman, T. 1997. The biochemisrey ans cell biology of embryo storage proteins. In Vasil IK (ed) Cellular ans Molecular Biology of Plant Seed Deveolpment, Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 151-220.

Underwood, G.E. Deatherage, F.E. 1952. Nitrogen compounds of coffee. Food Res 17:419-424.

USO DE PADRÕES ELETROFORÉTICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE CULTIVARES E DO NÍVEL DE DETERIORAÇÃO DE SEMENTES DE *Coffea arabica* L.

Brandão Jr., Delacyr da Silva[1] , Vieira, Maria das Graças Guimarães Carvalho[2], Bernadino Filho, José Roberto[3] , Hilhorst, Henk [4] , Guimarães, Rubens José [5]

[1]Aluno de Doutorado do Curso de Fitotecnia - UFLA; - [2]Professor Titular do departamento de Agricultura - UFLA;- [3]Aluno de Graduação do curso de Agronomia – UFLA; - [4]Professor de Fisiologia de Sementes - Wageningen Agricultural University - Holanda; - [5]Professor Adjunto do Departamento de Agricultura - UFLA.

INTRODUÇÃO

Com a tecnificação da agricultura, novos híbridos e cultivares de cafeeiro têm sido desenvolvidos visando atender as mais diversas exigências em termos de mecanização, produtividade, resistência à pragas e doenças dentre outras. Para assegurar a pureza genética de sementes, especialmente dos híbridos, órgãos responsáveis pela certificação de sementes têm procurado técnicas eficientes, seguras, rápidas de fácil treinamento, a serem utilizadas na identificação e caracterização de cultivares. Tradicionalmente a identificação de cultivares tem sido feita por caracteres morfológicos, o que exige estudos detalhados de sementes e plantas em crescimento, envolvendo um número recorde desses descritores. Além de ser um processo caro, envolvendo grande consumo de tempo e áreas extensivas, muitos desses descritores sofrem influência ambiental. Vários estudos têm enfatizado a importância e a versatilidade do uso de marcadores moleculares na identificação de cultivares. Dentre as técnicas disponíveis tem se destacado o uso de eletroforese de isoenzimas e proteínas, que têm sido incluídos nas regras da Internacional Seed Testing Association e no manual de pureza varietal da Association of Official Seed Analysts. Para a identificação de cultivares, via eletroforese, é necessário a seleção de sistemas isoenzimáticos que não sofram mudanças durante o processo deteriorativo de sementes. Sabe-se que as sementes de cafeeiro em condições normais perdem a viabilidade rapidamente. O presente trabalho foi realizado com os objetivos de verificar a possibilidade de diferenciar cultivares de cafeeiro por eletroforese de isoenzimas, bem como selecionar sistemas isoenzimáticos que não sofram interferência da deterioração de sementes, para fins de diferenciação de cultivares e detectar variações de perfis eletroforéticos de isoenzimas em sementes de cafeeiro com diferentes níveis de deterioração, visando selecionar marcadores para qualidade fisiológica de sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Análise e Biotecnologia de sementes da Universidade Federal de Lavras (MG), no período de novembro de 1997 a julho de 1998. Foram utilizadas sementes das cultivares Rubi (MG –1192), Catuaí Vermelho (CH 2077-2-5-99), Acaiá (Cerrado-MG 1474) e Icatu LCG-3282, oriundas de lotes com diferentes estágios de deterioração. As sementes tiveram seu perfil determinado pelos testes de 1ª contagem de germinação, teste de germinação, emergência em substrato areia/terra (2:1), índice de velocidade de emergência (Tabela 1). Para a avaliação da atividade enzimática, foi utilizado bulk de sementes inteiras e bulk de embrião. Para tal, foram retirados o pergaminho de duzentas sementes, que posteriormente foram liofilizadas, moídas à frio em presença de PVP. Paralelamente, foram retirados embriões de sementes, que foram liofilizados e moídos à frio em presença de PVP. As proteínas, tanto das sementes inteiras, quanto dos embriões, foram extraídas ressuspendendo 100 mg do pó em 200µl de tampão tris HCl 0,2M, pH 8,0 + 0,1% de β Me, 0,4% PVP, 0,4% PEG e 1mM de EDTA. Após a ressuspensão, a solução foi mantida por 1 hora em geladeira e posteriormente foi submetida a centrifugação à 14.000 xg por 60 minutos à 4 °C. A eletroforese foi desenvolvida em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel de separação) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. Após a eletroforese, os géis foram revelados para os sistemas: álcool desidrogenase (ADH), fosfatase ácida (ACP), catalase (CAT), esterase (EST), glutamato-oxalacetato-transaminase (GOT) e sorbitol desidrogenase (SDH).

Tabela 1. Valores médios de germinação e vigor de sementes de quatro cultivares de cafeeiro, oriundas de três diferentes lotes. UFLA, Lavras – MG, 1998.

	1ª contagem (%)	Germinação (%)	Emergência (%)	I.V.E. (índice)
Rubi 1	89.3 A	73.6 A	72.2 A	0.75 A
2	88.6 A	72.9 A	45.9 B	0.47 B
3	46.9 B	49.0 B	33.8 B	0.33 B
Catuaí 1	92.5 A	95.0 A	88.2 A	0.97 A
2	54.5 B	67.8 B	58.2 B	0.56 B
3	41.6 B	32.5 C	25.1 C	0.25 C
Acaiá 1	85.9 A	88.5 A	81.7 A	0.92 A
2	81.9 A	81.0 A	69.9 A	0.77 A
3	20.0 B	19.3 B	26.7 B	0.26 B
Icatú 1	89.9 A	89.2 A	83.5 A	0.91 A
2	88.6 A	87.8 A	86.1 A	0.98 A
3	63.6 B	65.7 B	48.5 B	0.49 B
Cv (%)	6.14	7.64	12.64	17.39

-Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.01$)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sistemas isoenzimáticos testados, não se apresentaram eficientes em diferenciar as cultivares de café em estudo. As variações encontradas em alguns perfis eletroforéticos (esterase e catalase) foram devidas ao processo deteriorativo das sementes. Provavelmente isto ocorreu, devido a diversidade das populações base, das quais elas foram selecionadas, ser muito estreita. Todas as cultivares testadas, tiveram de alguma forma a cultivar mundo novo como progenitor. A uniformidade genética dessas populações é ainda mais aumentada, pela sua natureza autógama. Desta forma, apesar de isoenzimas se apresentarem como um eficiente marcador genético para estimar diversidade genética e detectar diferenças em populações de diversas espécies, entre acessos de arábica elas não tem se mostrado eficientes (Orozco-castilho et al., 1994). Análises eletroforéticas de acessos de *C. arabica* da Etiópia e do Quênia, utilizando sistemas isoenzimáticos, não detectaram polimorfismo entre eles, sugerindo os autores, que as isoenzimas podem ser impróprias para estimar a diversidade em *C. arabica* (Orozco-Castilho et al., 1994). Há ainda a considerar que determinados sistemas enzimáticos (esterase e catalase) sofreram alterações em seus perfis eletroforéticos devido ao processo deteriorativo. Cuidados devem ser tomados na utilização desses sistemas em programas de identificação de cultivares; mas por outro lado, eles se apresentam como promissores marcadores bioquímicos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes. Vale ressaltar ainda, que os perfis eletroforéticos provenientes de extratos de proteína extraídos de embrião apresentam maior nitidez em relação aos de semente inteira, possibilitando maior segurança nas avaliações de deteriorização

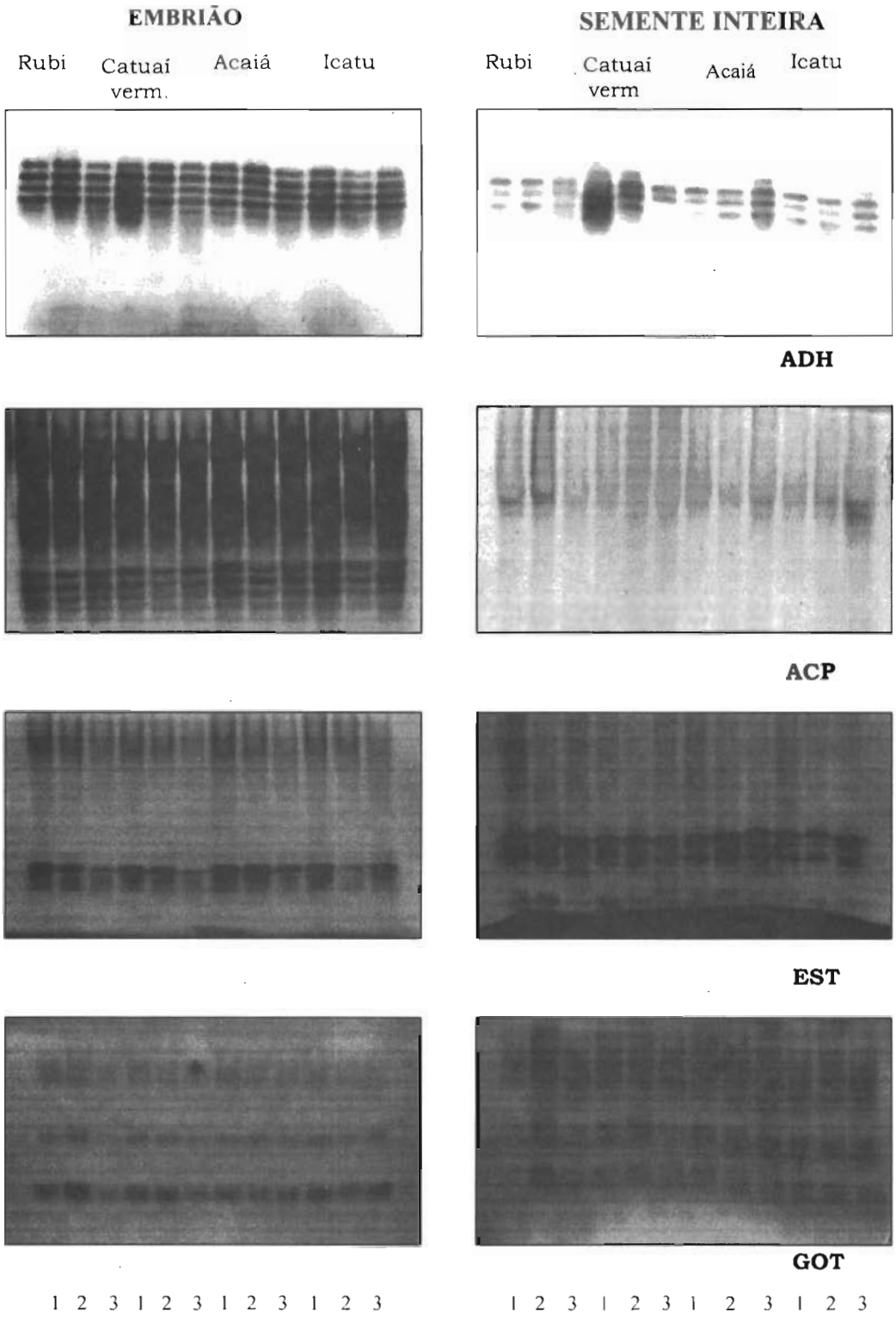


Figura 1. Padrões eletroforéticos de sementes de quatro cultivares de cafeeiro, com diferentes níveis. UFLA, Lavras-MG, 1998.

CONCLUSÃO

Os sistemas enzimáticos testados não diferenciam as cultivares de café Acaiá, Catuaí, Icatu e Rubi. As enzimas catalase e esterase apresentam-se como promissores marcadores bioquímicos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akkaya, M.S.; Bhagwat, A.A.; Cregan, P.B. 1992 Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean Genetics, v.132, p.1131-1139.

Alfenas, A. C. 1998 Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 574p.

Association of Official Seed Analysts. 1991 Cultivar purity testing, 371p.

Lopes, C. R. 1993 Phylogenetic studies of some species of the genus *Coffea* II - Numerical analysis of sioenzymatic data. Revista Brasileira de Genética. v.16, n.2, p.393-407.

VARIABILIDADE GENÉTICA OBTIDA POR RAPD EM ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE *Coffea*

Paulo M. Ruas[1], Leandro E. C. Diniz[1], Claudete F. Ruas[1] E Tumoru Sera[2]

[1]Laboratório de Citogenética e Genética Molecular de Plantas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL), 86051-990 Londrina - PR, Brasil.
[2]Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), 86001-970 Londrina - PR, Brasil.
e-mail: diniz@sercomtel.com.br **ou** ruas@sercomtel.com.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* (Rubiaceae) consiste de aproximadamente 80 espécies, as quais são nativas de regiões tropicais da África, Madagascar e ilhas vizinhas (Carvalho *et al.*, 1984). A produção internacional do café está concentrado em duas espécies, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Entretanto, as sementes de café podem ser produzidas por muitas outras espécies de *Coffea*. Além disso, o pool gênico, útil tanto para as gerações de *C. arabica* quanto para as de *C. canephora*, são feitas de todas as espécies de *Coffea* (Berthaud & Charrier, 1988).

As espécies de *C. arabica* são produzidas principalmente na América Latina e representam cerca de 73% da produção mundial de café. *Coffea canephora*, de outra forma, é produzido na África Central e do Norte, correspondendo a 80% da produção em todo o continente (Orozco-Castillo *et al.*, 1994). Considera-se que *C. canephora* produz um café com baixa qualidade de bebida, entretanto, esta espécie é uma importante fonte de genes de resistência para diversas doença do café. Muitos destes genes tem sido transferidos para *C. arabica* por hibridização artificial (Smith *et al.*, 1992).

Muitos esforços tem sido direcionados para explorar e preservar os recursos genéticos do café, vários métodos tem sido aplicados para descrever a variabilidade presente nas espécies de *Coffea*, incluindo, características morfológicas e agronômicas, eletroforese da distribuição de alelos variantes entre e dentro de populações, e análises genéticas das progênies de cruzamentos controlados (Charrier & Berthaud, 1985). Padrões de isozimas foram úteis para estimar a diversidade genética entre espécies de plantas como arroz (Peng *et al.*, 1988), *Chenopodium quinoa* (Wilson, 1988a, 1988b, 1990), *Ananas* (Dewald *et al.*, 1992; Aradhya *et al.*, 1994) e café (Guedes & Rodrigues, 1974; Payne & Fair-Brothers, 1976; Berthou & Trouslot, 1977; Berthou *et al.*, 1980). Entretanto, a análise da eletroforese em acessos de *C. arabica* oriundas da Etiópia e Quênia, com seis sistemas enzimáticos, revelam baixo nível de polimorfismo (Louarn, 1978). Os resultados contrastam com o alto nível de variação morfológica observada no mesmo germoplasma sugerindo que as isozimas não são apropriadas para descrever a diversidade genética das variedades e cultivares de *C. arabica*.

Marcadores moleculares tais como Amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) e Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) tem sido extensivamente e com sucesso usadas para estudar as relações filogenéticas em espécies de plantas (Gonzales & Ferrer, 1993; Heun *et al.*, 1994; Graham & McNicol, 1995), para estudar a diferenciação genética entre subespécies (Zhang *et al.*, 1992) e para acessar a diversidade genética inter e intra espécies (Abo-elwafa *et al.*, 1995; Liu, 1996; M'Ribu & Hilu, 1994; Link *et al.*, 1995; Ruas *et al.*, 1999). A utilidade da técnica de RAPD para estudar o gênero *Coffea* foi demonstrado por Lashermes *et al.* (1993), Orozco-Castillo *et al.* (1994), e Lashermes *et al.* (1996).

O Brasil é um dos principais produtores de café entre mais de 50 países da América Latina, África e Ásia. O estado do Paraná, localizado no sul do Brasil, é um importante produtor de café. Neste, estado, o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) mantém uma coleção de germoplasma com sete espécies de *Coffea*, algumas destas espécies tem genes para resistência a seca , geada e doenças. Além disso, a coleção do IAPAR preserva 40 variedades botânicas de *C. arabica*, e diversas populações de híbridos interespecíficos. A relação filogenética entre as espécies de *Coffea* e a origem dos prováveis híbridos mantidos nesta coleção não estão claramente definidos. Nesta investigação, procuramos nos ater a determinar as relações filogenéticas entre as sete espécies e seis híbridos de café utilizando a análise de RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal. As espécies e híbridos utilizados neste estudo são parte da coleção de germoplasma do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná, Brasil. O material inclui: *C. arabica* var. *arabica*, *C. canephora* var. *robusta*, *C. canephora* var. *kouillou*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. stenophylla* e seis híbridos interespecíficos.

Extração de DNA, amplificação e eletroforese. DNA genômico foi isolado a partir de tecido vegetal fresco segundo o método do CTAB (Doyle & Doyle, 1987), exceto que o CTAB foi substituído por MATAB (Mixed Alyltrimethylammonium Bromide, Sigma) no tampão de extração. A concentração do DNA foi estimado utilizando um fluorômetro DyNA Quant 200 (Höefer-Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação tiveram um volume final de 15 µl contendo 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl); 1,5 mM $MgCl_2$; 0,1 mM de cada dATP, dTTP, dCTP, and dGTP; 4 µM de 10 mer primers arbitrários (Operon Technologies); 1,8 U de *Taq* DNA polimerase (Klen *Taq*, AB Peptides), e 20 ng de DNA genômico. Para cada primer, foi utilizado uma reação controle, na qual é adicionado água no lugar do DNA. A amplificação foi feita utilizando um termociclador PTC 100 (MJ Research) 60 tubos, programado com 3 min à 94°C para uma denaturação inicial do DNA, seguida por 48 ciclos à 1 min em 94°C, 1 min 45 seg à 38°C, e 2 min à 72°C. O ciclo final é seguido por uma extensão de 7 min à 72°C. O produto do DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. Os marcadores obtidos foram avaliados para presença (1) e ausência (0) de bandas de DNA homólogas entre espécies e híbridos. Os dados gerados foram analisados utilizando o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers) V. 1,80. Um dendrograma (Figura 2) foi construído utilizando um método de agrupamento UPGMA baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 150 marcadores, entre sete espécies, uma com duas variedades, e seis híbridos interespecíficos de *Coffea*, foram obtidos com os 37 primers usados. Do total de marcadores, 97,8% eram polimórficos. A Figura 1 mostra o padrão de bandas obtidas com os primers OPAF-08 e OPR-11. As relações filogenéticas entre espécies e híbridos foi examinada pela análise de agrupamentos (Figura 2). A matriz de similaridade gerada pelos dados do RAPD são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz de similaridade genética baseada no no coeficiente de Jaccard para 14 acessos de *Coffea* spp obtidos a partir de 150 marcadores moleculares de RAPD.

	Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
(1)	*C. kapakata*	1.00													
(2)	*C. canephora kouillou*	0.70	1.00												
(3)	*C. canephora robusta*	0.77	0.86	1.00											
(4)	*C. eugenioides*	0.77	0.69	0.70	1.00										
(5)	Híbrido 1	0.78	0.69	0.73	0.93	1.00									
(6)	*C. racemosa*	0.68	0.60	0.64	0.58	0.57	1.00								
(7)	Híbrido 2	0.74	0.66	0.74	0.71	0.76	0.67	1.00							
(8)	*C. arabica*	0.79	0.68	0.76	0.84	0.91	0.58	0.80	1.00						
(9)	Híbrido 3	0.68	0.62	0.68	0.72	0.73	0.54	0.68	0.75	1.00					
(10)	Híbrido 4	0.56	0.50	0.50	0.50	0.50	0.48	0.59	0.51	0.73	1.00				
(11)	*C. dewevrei*	0.72	0.75	0.75	0.72	0.72	0.62	0.68	0.69	0.66	0.52	1.00			
(12)	Híbrido 5	0.76	0.68	0.72	0.91	0.95	0.56	0.73	0.88	0.72	0.51	0.70	1.00		
(13)	*C. stenophylla*	0.67	0.70	0.71	0.79	0.76	0.62	0.68	0.73	0.68	0.51	0.72	0.76	1.00	
(14)	Híbrido 6	0.75	0.68	0.71	0.86	0.86	0.55	0.70	0.82	0.71	0.54	0.77	0.88	0.76	1.00

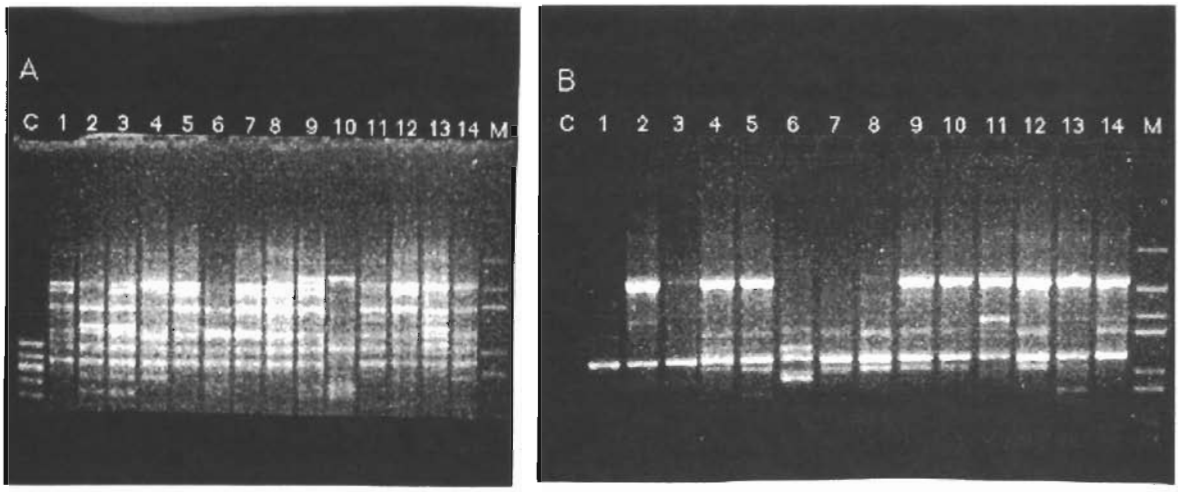


Figura 1. Padrão de bandas obtidas com os primeiros OPAF 08 e POR 11 em sete espécies e seis híbridos interespecíficos de *Coffea:* (C) reação controle; (1) C. *Kapakata;* (2) *C. canephora* var. *Kouillou;* (3) *C.canephora* var. *robusta*: (4) *C. eugenioides;* (5) Híbrido n^0 . 1; (6) *C.racemosa*: (7) Híbrido n^0 . 2; (8) *C.arabica* var. *arabica;* (9) Híbrido n^0 . 3; (10) Híbrido n^0. 4; (11) *C.dewevrei;* (12) Híbrido n^0 5; (13)*C.stenophylla*; (14)Híbrido n^0. 6; (M) Marcador de peso molecular pUC-19.

A análise dos agrupamentos mostra um coeficiente de similaridade entre espécies variando de 0.58 (*C. eugenioides* e *C. racemosa*, *C. arabica* e *C. racemosa*) a 0.84 (*C. arabica* e *C. eugenioides*), revelando um alto nível de variação genética. Os dados do RAPD mostram que *C. arabica* tem um associação muito grande com C. *eugenioides* (84%) seguida por *C. kapakata* (79%), *C. canephora* var. *robusta* (76%), *C. stenophylla* (73%), *C. dewevrei* (69%), *C. canephora kouillou* (68%), e *C. racemosa* (58%). Estes resultados são consistentes com Lashermes *et al.* (1995) e Orozco-Castillo *et al.* (1996), os quais demonstraram que *C. arabica* tem baixa relação genética com *C. racemosa* e tem mais afinidade com *C. eugenioides* do que com *C. canephora*. Experimentos envolvendo o cruzamento *C. arabica* vs *C. canephora* tetraplóide produziram híbridos F_1 com baixo índice de fertilidade (Owuor & Van Der Vossen, 1981). Estimativas da distância genética para 3-8 sistemas de enzimas (Berthou *et al.*, 1980) mostraram que a distância genética entre *C. canephora* e *C. eugenioides* são consideráveis. Estes dados também são confirmados por Berthou *et al.* (1983) através de análise eletroforética de fragmentos de DNA mitocondrial e cloroplástico, cortado com enzimas de restrição. Naquela investigação, os autores observaram que *C. arabica* e *C. eugenioides* tem uma alta similaridade e pode ter uma origem comum. Dados de cruzamentos também são concordantes com os dados de RAPD. Charrier & Berthaud (1985) mostraram que *C. eugenioides* se cruza em geral muito melhor com todos os outros diplóides do que com *C. canephora*. A estreita similaridade genética (0.84), revelado por marcadores de RAPD entre *C. arabica* e *C. eugenioides* (Tabela 1, Figura 2) é também, consistente com trabalhos anteriores, sugerindo que *C. eugenioides* é um dos ancestrais de *C. arabica*.

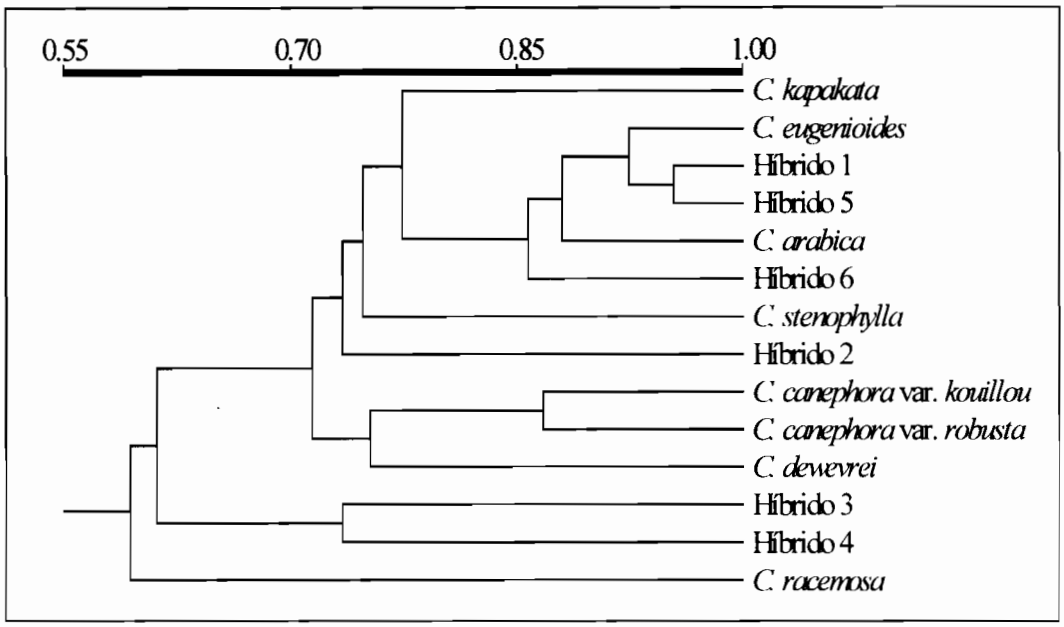


FIG.2

Raina *et al.* (1998) utilizando FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) em espécies de *C. eugenioides*, *C. congensis*, *C. canephora*, *C. liberica* e *C. arabica* mostrou que o DNA genômico de *C. eugenioides* hibridiza preferencialmente com os 22 cromossomos de *C. arabica*. Os outros 22 cromossomos de *C. arabica* hibridizam com o DNA genômico de *C. congensis*. Entretanto, Lashermes *et al.* (1999) aplicando as técnicas de RFLP e GISH sugeriram que *C. eugenioides* e *C. canephora* são os prováveis progenitores de *C. arabica*. Os resultados sugerem fortemente que *C. eugenioides* é um dos parentais de *C. arabica*, entretanto, a participação de *C. canephora* não está claramente definida com os dados obtidos por RAPD.

Análise dos híbridos interespecíficos de *Coffea* - Os marcadores obtidos por RAPD foram aplicados para deduzir os prováveis parentais de seis híbridos naturais de *Coffea*, os quais apresentam características de interesse para os programas de melhoramento representando, por exemplo, uma importante fonte de genes para resistência a muitas doenças de *C. arabica*.

Híbridos n°. 1 e n°. 5 agruparam-se com um coeficiente de similaridade de 0.95 tendo uma similaridade média de 0.91 e 0.90 com *C. eugenioides* e *C. arabica*, respectivamente (Tabela 1, Figura 2). Híbridos n°. 1 e n°. 5 são tetraplóides altamente férteis e são ambos como *C. arabica* no padrão morfológico. Deste modo, como foi sugerido a partir dos caracteres morfológicos e dos dados obtidos por RAPD, eles podem ser originados por cruzamento entre *C. eugenioides* e *C. arabica* seguido por sucessivos retrocruzamentos com parental arabica.

Híbrido n°. 2 tem um coeficiente de similaridade de 0.8 com *C. arabica* e de 0.67 com *C. racemosa* (Tabela 1). Este híbrido é um triplóide estéril que pode ter sido originado a partir de um parental diplóide e outro tetraplóide. O fenótipo do híbrido n°. 2 é similar àquele de *C. arabica* o qual é um tetraplóide e mostra uma alta associação com o híbrido n°. 2 através dos marcadores obtidos por RAPD. As folhas do híbrido n°. 2 entretanto, são estreitas como as de *C. racemosa*. Com base nos dados morfológicos e moleculares sugere-se que *C. arabica* e *C. racemosa* são os prováveis parentais deste híbrido.

Híbridos n°. 3 e n°. 4 agruparam-se com um coeficiente de similaridade de 0.73. O híbrido n°. 4 associou em 0.51 com *C. arabica* e em 0.52 com *C. dewevrei*. O híbrido n°. 3, por outro lado, associou em 0.75 com *C. arabica* e em 0.66 com *C. dewevrei*. Os híbridos n°s. 3 e 4 são morfologicamente similares a ambas as espécies. A associação genética detectada com marcadores moleculares obtidos com RAPD (Tabela 1) entre estes híbridos e o diplóide *C. dewevrei* e o tetraplóide *C. arabica* sugere que as plantas híbridas F_1 (híbrido n°. 4) levando gametas com combinações cromossômicas específicas foram retrocruzadas com o parental recorrente *C. arabica* originando o híbrido n°. 3.

Híbrido n°. 6 associou muito estreitamente com *C. eugenioides*, *C. arabica*, seguido por *C.*

dewevrei e *C. stenophylla* (Tabela 1, Figura 2). É conhecido entretanto, que *C. stenophylla* é o parental feminino do híbrido nº. 6. As características morfológicas do híbrido nº. 6 é intermediária entre as espécies, exceto para folhas largas e caule roxo, os quais são similares à *C. dewevrei*. Enquanto os resultados obtidos com RAPD não são conclusivos, o fenótipo das folhas e caules sugerem que *C. dewevrei* pode estar envolvido na origem deste híbrido.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os marcadores moleculares de RAPD podem ser aplicados com sucesso para a análise da relação filogenética entre espécies de *Coffea* e para deduzir os prováveis parentais dos híbridos interespecíficos.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) e Universidade Estadual de Londrina.

BIBLIOGRAFIA

Abo-elwafa, A., Murai, K. & Shimada, T. (1995). Intra and interspecies variation in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 335-340

Aradhya, M.K., Zee, F. & Manshardt, R.M. (1994). Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica*, **79**, 87-99

Berthaud, J. & Charrier, A. (1988). Genetic Resources of *Coffea*. In- *Coffee Agronomy*, Vol. 4, R.J. Clarke & R. Macrae (eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., pp. 1-42

Berthou, F. & Trouslot, P. (1977). L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en serie. Premiers résultants in 8th International Colloquium on the Chemistry of Coffee, ASIC, Paris, pp. 373-83

Berthou, F., Mathieu, C. & Vedel, F. (1983). Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationship in genus *Coffea* L. *Theor. Appl. Genet.*, **65**, 77-84

Berthou, F., Trouslot, P., Hamon, S., Vedel, F. & Ouetier, F. (1980). Analyse en électrophorèse du polumorphisme biochimique des caféiers: variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages: *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. *Café Cacao Thé*, **624**, 313-326

Carvalho, A., Medina-Filho, H.P. & Fazuoli, L.C. (1984). Evolução e melhoramento do cafeeiro. In- *Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas*, M.L.R. Aguiar-Perecin, P.S. Martins & G. Bandel (eds.), Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, S.P., Brazil. pp. 215-235

Charrier, A. & Berthaud, J. (1985). Botanical classification of coffee. In- *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, M.M. Clifford & K.C. Wilson (eds.), Croom Hel Publ., Beckenham, UK, pp. 13-47

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**(1): 11-15

Dewald, M.G., Moore, G.A. & Sherman, W.B. (1992). Isozymes in *Ananas* (pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **117**, 491-496

Gonzales, J.M. & Ferrer, M. (1983). Random Amplified Polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. *Genome*, **36**, 1029-1031

Graham, J. & McNicol, R.J. (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 1128-1132

Guedes, M.E.M. & Rodrigues Jr, C.J. (1974). Disc electrophoresis patterns of phenoloxidase from leaves of Coffee cultivars. *Portugaliae Acta Bioloica*, **13**, 169-178

Heun, M., Murphy, J.P. & Phillips, T.D. (1994). A comparison of RAPD and isozyme analysis for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 689-696

Lashermes, P., Cros, J., Marmey, P. & Charrier, A. (1993). Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **40**, 91-99

Lashermes, P., Combes, M.C., Roberts, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthoni, F. & Charrier, A. (1999). Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molec. Gen. Genet.*, **261**, 259-266

Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M.C. & Charrier, A. (1996). Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica*, **87**, 59-64

Link, W., Dixkens, C., Singh, M., Schwall, M. & Melchinger, A.E. (1995). Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germoplasm revealed by RAPD. *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 27-32

Liu, C.J. (1996). Genetic diversity and relationships among *Lablab purpureum* genotypes evaluated using RAPD as markers. *Euphytica*, **90**, 115-119

Louarn, J. (1978). Diversité compararée des descendances de *Coffea arabica* obtenues en

autofécondation et en fécondation libre au Tonkoui. In- *Etude de la Structure et de la Variabilité Génétique des Caféiers,* A. Charrier (ed.), IFCC Bulletin, n. 14, pp. 75-78

Keil, M. & Griffin, A.R. (1994), Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.*, **89**, 442-450

Michelmore, R.W., Paran, I.E. & Kesseli, R.V. (1991), Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **88**, 9828-9832

M'Ribu, H.K. & Hilu, K.W. (1994), Detection of interspecific and intraspecific variation in *Panicum millets* through random amplified polymorphic DNA. *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 412-416

Orozco-Castillo, C., Chalmers, K.J. & Powell, R.W. (1994), Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 934-940

Owuor, J.B.O. & Van Der Vossen, H.A.M. (1981), Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. ex Fr. I. Fertility in F_1 hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica*, **30**, 861-866

Payne, R.C. & Fair-Brothers, D. E. (1976), Disc electrophoresis evidence for heterozygosity 111and phenotypic plasticity in selected lines of *Coffea arabica* L. *Bot. Gazette*, **137**, 1-6

Peng, J.Y., Glaszman, J.C. & Virmani, S.S. (1988), Heterosis and isozyme divergence in indica rice. Crops Sci., **28**, 561-563

Raina, S.N., Mukai, Y. & Yamamoto, M. (1998), *In situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theor. Appl. Genet.*, **97**, 1204-1209

Ram, A.S., Sreenivasan, M.S. & Vishveshwara, S. (1982), Chemotaxonomy of Mozambicoffea. *J. Coffee Research* (Chikmagalur), **12**, 42-6

Ruas, P.M., Bonifácio, A., Ruas, C.F., Fairbanks, D.J. & Andersen, W.R. (1999), Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD). *Euphytica*, **105**, 25-32

Ruas, P.M., Ruas, C.F., Fairbanks, D.J., Andersen, W.R. & Cabral, J.R.S. (1995), Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Bras. J. Genet.*, **18**, 413-416

Smith, N.J.H., Williams, J.R., Plucknett, D.L. & Talbot, J.P. (1992), Tropical forests and their crops. Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY., pp. 20-37

Weising, K., Nylom, H., Wolff, K. & Meyer, W. (1995), DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida., pp. 322

Welsh, J. & McClelland, M. (1990), Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 7213-7218

Wilson, H.D. (1988a), Quinua biosystematic I: free-living populations. *Econ. Botan.*, **42**, 461-477

Wilson, H.D. (1988b), Quinua biosystematic II: free-living populations. *Econ. Botan.*, **42**, 478-494

Wilson, H.D. (1990), Gene flow in squash species. *Bioscience*, **40**, 449-455

Zhang, Qifa, Saghai Maroof, M.A., Lu, T.Y. & Shen, B.Z. (1992), Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **83**, 495-499

POLIMORFISMO GENÉTICO DETECTADO EM 40 VARIEDADES E CULTIVARES DE *Coffea arabica* UTILIZANDO RAPD ASSOCIADO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Leandro E.C. Diniz[1], Paulo M. Ruas[1], Claudete F. Ruas[1] e Tumoru Sera[2]

[1] Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil
[2] Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil
e-mail: **diniz@sercomtel.com.br**

ABSTRACT

The genetic variability of 40 varieties and cultivars of Coffea arabica was avaluated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) associated with a prior restriction digestion with EcoRI, HaeIII, and BamHI. The acessions include 5 varieties also considered as old cultivars, 10 varieties, 11 recent cultivars, 2 local cultivars, 8 experimental cultivars, 3 mutants, and 1 germoplasm of C. arabica, obtained from the Coffea collection, maintaned at the IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná), Londrina, Paraná, Brazil. The genetic variability of the most important cultivars of Coffea arabica and the genetic relantioships among all varieties were determined in a preliminary analysis using 185 differents RAPD primers, no polymorphism or low level of polimorphic bands were observed. To improve the level of polymorphism, the DNA of all varieties were digested with restriction enzymes prior to amplification. Twenty three primers used alone or associated with restriction enzymes, that suggested polymorphism were selected to amplify the DNA of all varieties and cultivars. A dendogram was constructed using UPGMA. A total of 236 amplification products were obtained, with 216 polymorphic bands (91,5%). The results showed the usefulness of restriction enzymes to detect polymorphism in varieties and cultivars of Coffea.arabica.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, um dos principais estados produtores de café é o Paraná. Neste estado, o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) mantém um banco de germoplasma com 8 diferentes espécies de *Coffea*, sendo algumas destas espécies, fonte de resistência à seca, geada e outras doenças que atacam o café. Além destas espécies, a coleção do banco mantido pelo IAPAR inclui 26 diferentes variedades e cultivares de *C. arabica*, várias populações de híbridos interespecíficos, 144 acessos de *C. arabica* da Etiópia, 30 acessos de *C. canephora*, 50 progênies de Kattimor, 200 progênies de Icatu, 50 progênies de Sarchimor, 50 linhagens de Mundo Novo, 50 linhagens de Catuaí e 20 linhagens de Acaiá.

A coleção de *Coffea* mantida no IAPAR não foi ainda caracterizada quanto ao seu potencial. Deste modo, os recursos genéticos do Banco de germoplasma não tem sido amplamente explorados. O acesso à variabilidade genética é de extrema importância em qualquer coleção de germoplasma. Usando este conhecimento, genótipos podem ser comparados para determinação do grau de similaridade genética facilitando o manejo dos recursos genéticos existentes.

O desenvolvimento da biologia molecular resultou em técnicas alternativas baseadas na análise do DNA. Umas das técnicas mais conhecidas é o polimorfismo gerado por fragmentos obtidos com enzimas de restrição (RFLP), esta metodologia, no entanto, é cara e
laboriosa. Welsh e McClelland (1990) e Williams *et al.* (1990) desenvolveram uma nova metodologia baseada na análise de seqüências de DNA amplificadas ao acaso. Esta técnica, conhecida como RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), faz uso de 10 nucleotídeos de seqüência conhecida e tem sido intensamente utilizado para detectar polimorfismo em plantas.

A informação obtida para o germoplasma de *C. arabica* a partir de marcadores moleculares pode facilitar o acesso e a utilização dos recursos genéticos mantidos na coleção, aumentando, portanto, a eficiência na caracterização genética da coleção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste trabalho faz parte da coleção de *Coffea* do Banco de germoplasma do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Designação e países de origem dos acessos de *Coffea arabica* estudados:

Acessos	Designação	Origem
Acaiá	cultivar atual	Brasil
Arábica	variedade e cultivar antigo	Brasil/ Etiópia
Arábica superprecoce	germoplasma de *Coffea arabica*	Etiópia
Bourbon amarelo	variedade e cultivar antigo	Brasil
Bourbon vermelho	variedade e cultivar antigo	Ilhas Reunião
Catuaí amarelo	cultivar atual	Brasil
Catuaí vermelho	cultivar atual	Brasil
Catuaí amarelo erecta	mutante de Catuaí amarelo	Brasil
Catuaí rubi vermelho	cultivar atual	Brasil
Catuaíamarelo semperflorens	mutante de Catuaí amarelo	Brasil
Catuaí SH_1SH_3	cultivar experimental	Brasil
Caturra amarelo	variedade e cultivar antigo	Brasil
Caturra vemelho	variedade e cultivar antigo	Brasil
Cera	Variedade	Brasil
Cioicie	cultivar local	Etiópia
Colômbia amarelo	cultivar atual	Colômbia
Geisha	cultivar local	Etiópia
Goiaba	Variedade	Brasil
Iapar 59 (75.163-22)	cultivar atual	Brasil
Iapar 75.163-12	cultivar experimental	Brasil
Iapar 75.163-21-10	cultivar experimental	Brasil
Iapar 77.028 amarelo	cultivar experimental	Brasil
Iapar 88.480 tupi	cultivar atual	Brasil
Icatu amarelo 2944	cultivar atual	Brasil
Icatu precoce 3282	cultivar atual	Brasil
Icatu vermelho 2945	cultivar atual	Brasil
Icatuaí Iapar 77.055	cultivar experimental	Brasil
Kattimor	cultivar experimental	Brasil/Portugal
Laurina	Variedade	Brasil
Maragogipe	Variedade	Brasil
Mokka	Variedade	Brasil
Mundo Novo 376-4	cultivar atual	Brasil
Mundo Novo semperflorens	mutante de Mundo Novo	Brasil
Mundo Novo X Iapar 59 (F_1)	cultivar experimental	Brasil
Mundo Novo X Iapar 59 (F_2)	cultivar experimental	Brasil
Purpurascens	Variedade	Brasil
San Bernardo	Variedade	Costa Rica
Semi-erecta	Variedade	Brasil
Villa Lobos	Variedade	Costa Rica
Villa Sarchi	Variedade	Costa Rica

2.1. Extração

Para a extração de DNA, foi utilizado a técnica descrita por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações. O DNA purificado foi quantificado e diluído à uma concentração final de 10 ng/µl. Foi utilizada a metodologia da "Análise de segregação de bulks" (Michelmore *et al.*, 1991).

2.2. Amplificação de DNA

As reações de amplificação para o RAPD tiveram 15 µl de reagentes, sendo 7,4 µl de água (HPLC); 1,5 µl de tampão 10X (50 mM Tris-HCl pH 9.1, 16 mM de sulfato de amônia, 35 mM $MgCl_2$ e 150 µg/mL BSA (albumina de soro bovino)); 1,5 µl de dNTPs (0,1 mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 2,0 µl de primer (0,4 µM); 2,0 µl de DNA (10 ng/µl) e 0,07 µl (0,7 unidade) de Taq polimerase da marca Klen Taq 1. As amostras diluídas (10 ng/µl) de DNA genômico de cada variedade ou cultivar foram digeridas com algumas enzimas de restrição diferentes, tais como: EcoRI, HaeIII ou BamHI, durante 1 hora à 37°C, seguida da reação de amplificação. As amostras foram amplificadas em um ciclador térmico PTC 100 para 60 tubos da MJ Research. O programa utilizado segue o descrito por Ruas *et al.*(1999). O produto de amplificação obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,4%, corada com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. A análise dos resultados foi feita com o auxílio do programa NTSYS ("Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis") utilizando o

método SIMQUAL ("Similarity for qualitative data") com o coeficiente de similaridade de Jaccard.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de RAPD combinada com a digestão do DNA a ser amplificado utilizando enzimas de restrição (BamHI, EcoRI e HaeIII) permitiu a detecção de polimorfismo em 40 acessos de *C. arabica*. Um total de 23 primers, associados ou não com enzimas de restrição foram usados para amplificação do DNA de 15 variedades, das quais, cinco também são consideradas cultivares antigos, 11 cultivares atuais, oito cultivares experimentais, dois cultivares locais, três mutantes e um germoplasma de *C. arabica* introduzido recentemente na coleção. Um total de 236 marcadores, com pesos moleculares variando entre 300 a 2.200 pb, foram obtidos. Na maioria das reações submetidas a digestão enzimática antes do início do programa de amplificação, não foi observado aumento significativo no número de bandas em relação às reações amplificadas sem digestão prévia. Entretanto, um padrão diferente de produtos de amplificação foi obtido, melhorando deste modo a eficiência dos primers.

O **dendograma** gerado a partir dos dados obtidos associou os acessos em quatro grupos distintos (Figura 1).

No primeiro agrupamento observaram-se três subgrupos sendo que o primeiro destes associa as variedades arábica, bourbon vermelho e bourbon amarelo. As variedades arábica e bourbon vermelho mostraram uma similaridade de 91%, enquanto Bourbon amarelo apresentou 84% de similaridade com as duas outras variedades. Bourbon vermelho é uma mutação espontânea ocorrida em cultivares da variedade arábica, introduzidos na Ilha Reunião, a partir de cultivares da Etiópia. Bourbon amarelo também é um mutante encontrado em progênies provenientes do cruzamento Arábica X Bourbon vermelho. No segundo subgrupo o cultivar Acaiá associa-se ao mutante Mundo Novo semperflorens e com o cultivar Mundo Novo 376-4 com coeficientes de similaridade de 84% e 82%, respectivamente. Mundo Novo originou-se do cruzamento natural entre a variedade Sumatra X Bourbon vermelho. O cultivar Acaiá originou-se de seleção em plantas do cultivar Mundo Novo (Fazuoli, 1986). Mundo Novo semperflorens é uma mutação espontânea ocorrida em Mundo Novo. No terceiro subgrupo, as cultivares Catuaí amarelo, Catuaí vermelho e o mutante Catuaí amarelo semperflorens associam-se com uma similaridade média de 89%. Ambos, Catuaí amarelo e Catuaí vermelho surgiram por hibridação artificial entre Caturra amarelo X Mundo Novo (Fazuoli, 1986). Catuaí amarelo semperflorens é um mutante de Catuaí amarelo. No segundo agrupamento, aparecem três subgrupos, sendo que no primeiro o cultivar Icatuaí Iapar 77.055 e a variedade Caturra amarelo se associam com 82% de similaridade. A cultivar Catuaí rubi vermelho agrupa-se com Icatuaí Iapar 77.055 e com Caturra vermelho com 80% e 77%, respectivamente. A cultivar Catuaí rubi vermelho originou-se do cruzamento entre Catuaí vermelho e Mundo Novo. No segundo subgrupo, Icatu precoce 3282 e Caturra vermelho associam-se com 88% de similaridade. Icatu precoce 3282 foi obtido a partir do cruzamento entre *C. canephora* e *C. arabica* var. bourbon vermelho sendo o F_1 retrocruzado com Mundo Novo. O terceiro subgrupo associou os cultivares Icatu amarelo e Icatu vermelho com similaridade genética de 88%. A cultivar Icatu amarelo foi obtido por seleção de plantas resultantes de hibridação natural entre Icatu vermelho X Bourbon amarelo ou Mundo Novo amarelo (Fazuoli, 1986). Os resultados obtidos com RAPD sugerem que Mundo Novo amarelo e Icatu vermelho são os prováveis parentais de Icatu amarelo. Ainda no mesmo subgrupo as variedades Mokka e Laurina apresentam uma similaridade genética de 86%. De acordo com Wrigley (1988), Laurina é proveniente da variedade Bourbon e Mokka apresenta uma relação estreita com Laurina como mostram os resultados obtidos com RAPD.

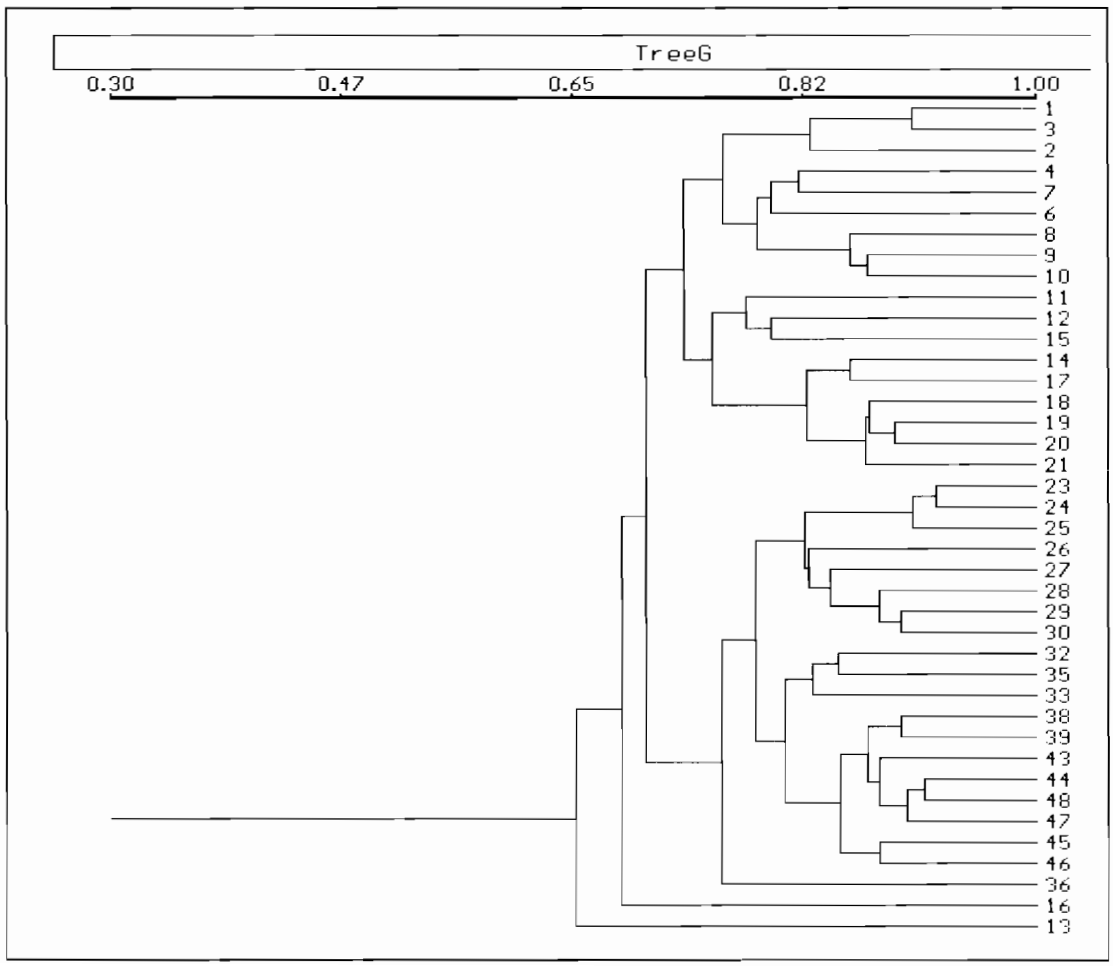
No terceiro agrupamento observam-se dois subgrupos. No primeiro, a variedade Villa Lobos mostra uma similaridade genética de 92% com as variedades San Bernardo e Villa Sarchi. As três variedades originaram-se de Caturra vermelho, na Costa Rica. Esta relação é confirmada pela estreita afinidade genética encontrada com os marcadores moleculares. No segundo subgrupo encontram-se cinco cultivares (Colômbia amarelo, Iapar 77028 amarelo, Iapar 59 (75.163.22), Iapar 88.480 tupi e Iapar 75.163.21-10). Uma similaridade genética de 90% foi encontrada entre os cultivares Iapar 88.480 tupi e Iapar 75.163.21-10, enquanto Iapar 59 mostrou-se 89% e 88% similar aos cultivares Iapar 75.163.21-10 e Iapar 88.480 tupi, respectivamente. Os altos índices de similaridade genética derivam do fato destas cultivares terem uma origem comum, a partir de cruzamentos entre os híbridos de Timor X Caturra ou Villa Sarchi. A cultivar Villa Sarchi mostra uma relação genética de 85% com as cultivares Iapar e pode, portanto, estar envolvida nos cruzamentos que originaram tais cultivares. O quarto grupo, mostra uma associação entre 11 acessos, divididos em quatro subgrupos. No primeiro subgrupo, o cultivar Iapar

75.163-12 associa-se com o híbrido (F_1) originado do cruzamento entre Mundo Novo X Iapar 59 e com o cultivar Kattimor com 86% e 83% de similaridade, respectivamente. O cultivar Kattimor é um germoplasma de Sarchimor, cuja origem se deu através através do cruzamento entre Villa Sarchi e o híbrido de Timor. Kattimor associou-se a Villa Sarchi com 82% de similaridade. No segundo subgrupo, *C. arabica* var. *semi-erecta*, agrupou-se com o mutante Catuaí amarelo erecta em 91%. No terceiro subgrupo, as variedades Goiaba, Maragogipe, Purpurascens e Cioicie agruparam-se com 91% de similaridade genética, enquanto Goiaba e Purpurascens associaram com 90% de similaridade. a Origem de Maragogipe, Goiaba e Purpurascens se deu a partir de mutações diferentes ocorridas na variedade Bourbon, explicando o alto índice de similaridade observado entre estas variedades. Cera e Geisha associam-se com 87% de similaridade.

O F_2 originado do cruzamento Mundo Novo X Iapar 59, aparece isolado, mostrando uma relação de 80% de similaridade com as cultivares Iapar 59, Iapar 88.480 tupi e Iapar 75.163-21-10. A cultivar Arábica superprecoce apresentou baixo coeficiente de similaridade com as outras amostras, provavelmente devido às muitas diferenças fenotípicas observada entre esta cultivar e as demais variedades e cultivares.

Finalmente, o cultivar Catuaí SH_1SH_3 aparece como um "outgroup", mostrando uma similaridade média de 60% com os demais acessos. Isto pode ser facilmente explicado, uma vez que Catuaí SH_1SH_3 possui germoplasma de *Coffea liberica*.

Figura 2. Dendograma de similaridade para as 40 variedades e cultivares de *Coffea arabica*: 1- arabica; 2-bourbon amarelo; 3-bourbon vermelho; 4-acaia; 6-mundo novo 376-4; 7-mundo novo semperflorens; 8-catuai semperflorens; 9-catuai amarelo; 10-catuai vermelho; 11-catuai rubi vermelho; 12-icatuai Iapar 77055; 13-catuai SH_1SH_3; 14-caturra vermelho; 15-caturra amarelo; 16-arabica superprecoce; 17-icatu precoce 3282; 18-icatu amarelo 2944; 19-icatu vermelho 2945; 20-mokka; 21-laurina; 23-villa lobos; 24-san bernardo; 25-villa sarchi; 26-colombia amarelo; 27-Iapar 77028 amarelo; 28-Iapar 59; 29-Iapar 88480 tupi; 30-Iapar 75163-21-10; 32-Iapar 75163-12; 33-kattimor; 35-mundo novo X Iapar 59 (F_1); 36-mundo novo X Iapar 59 (F_2); 38-semierecta; 39-catuai amarelo erecta; 43-goiaba; 44-maragogipe; 45-cera; 46-geisha; 47-cioicie; 48-purpurascens.



4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L.. 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, Vol. 19 (1): 11-15.

FAZUOLI, L.C. 1986. Genética e Melhoramento do cafeeiro. Cultura do Cafeeiro, Fatores que afetam a produtividade. Associação Brasileira para Pesquisa Da Potassa e do Fosfato. Piracicaba-SP.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88: 9828-9832.

OROZCO-CASTILHO, C.; CHALMERS, K. J. & POWELL, R.W. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.

RUAS, P.M.; BONIFACIO, A.; RUAS, C.F.; FAIRBANKS, D.J. & ANDERSEN, W.R. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD). Euphytica **105**: 25-32.

TAUNAY, A.E. 1939. História do café no Brasil. Rio de Janeiro. Departamento Nacional do Café, 452p.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

WELSH, J.; PETERSEN, C. & McCLELLAND, M. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: Application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research* 20: 303-306.

WILLIAMS, J.G.K.; JUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. & RAFALSKI, J.A. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

WRIGLEY, G. 1988. Coffee. Tropical Agriculture Series. Longman Scientific & Technical. New York. USA.

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE *Coffea* POR MARCADORES RAPD

Terezinha A. Teixeira[1,2], Ney S. Sakiyama[1,2], Laércio Zambolim[1,3], Antônio A. Pereira[4], Cássia C. H. Sakiyama[1]

[1]BIOAGRO/UFV; [2]DFT/UFV; [3]DFP/UFV; [4]EPAMIG. 36571-000 Viçosa,MG.
Apoio Financeiro: FAPEMIG, FINEP, CNPq, PNP&DCafé

INTRODUÇÃO

O subgênero *Coffea* compreende cerca de 100 espécies distribuídas em diferentes seções. Das espécies cultivadas *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* (café robusta) são as de maior importância econômica, embora, outras espécies tenham uma valiosa reserva de genes para diferentes propostas do melhoramento genético (LASHERMES et al., 1993).

Pesquisas na área do melhoramento genético do cafeeiro no Brasil resultaram na obtenção de cultivares com potencial produtivo quase 240% superior às cultivares tradicionais. Entretanto, evidências históricas indicam que as populações básicas para as seleções das cultivares atuais originaram de poucas plantas introduzidas na América Latina vindas do Yemen. A ampliação da base genética tornou-se importante para o melhoramento genético desta cultura. Informações sobre distâncias genéticas entre acessos de um banco de germoplasma baseadas em marcadores moleculares podem ser úteis na identificação da diversidade genética.

Os objetivos deste trabalho foram: a) avaliação da diversidade genética entre 38 genótipos de café do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa; b) caracterização molecular de 16 linhagens comerciais de café arábica usando a técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico ("RAPD") (WILLIAMS et al., 1990).

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Na Tabela 1 estão listados os 38 genótipos do banco de germoplasma avaliados quanto à diversidade genética com base em marcadores RAPD.

Na Tabela 2 encontram-se listados as 16 linhagens comerciais de café arábica utilizadas para caracterização molecular por marcadores RAPD.

Tabela 1 - Lista dos 38 genótipos de cafeeiro utilizados.

GENÓTIPOS	GENÓTIPOS
01. *Coffea racemosa* (UFV-545-57)	20. Mundo Novo (UFV-2191)
02. *Coffea congensis* (UFV-3097)	21. Bourbon Amarelo de Portugal (UFV-535)
03. *Coffea canephora* (UFV-3755)	22. Bourbon
04. Triplóide	23. Bourbon da China (progênie 5288 II 1)
05. Híbrido de Timor (UFV-4106)	24. Bourbon da China (progênie 5288 II 2)
06. Híbrido de Timor (UFV-376-52)	25. Caturra (UFV-534-4)
07. Típica da China	26. Catimor (UFV-395-141)
08. Típica de Portugal (UFV-536)	27. Catimor (UFV-386-19)
09. Catuaí (UFV-2237)	28. Catimor (UFV-1310)
10. Catuaí (UFV-2144)	29. Catimor (UFV-1359)
11. Catuaí (UFV-2147)	30. Catimor (UFV-2983)
12. Catuaí (UFV-2145)	31. Mundo Novo x Híbrido de Timor (H-484-2)
13. Catuaí (UFV-2154)	32. Catuaí x Híbrido de Timor (H-415-3)
14. Catuaí (UFV-2155)	33. Mundindu (UFV-315-76)
15. Catuaí (UFV-2156)	34. Cachimor (UFV-351-13)
16. Mundo Novo (UFV-2190)	35. Cavimor (UFV-357-4)
17. Mundo Novo (UFV-2164)	36. San Ramon (UFV-3094)
18. Mundo Novo (UFV-2150)	37. Airi (UFV-3095)
19. Mundo Novo (UFV-2163)	38. Purpuracens (UFV-4072)

Tabela 2 - Lista das 16 linhagens comerciais de cafeeiro utilizadas.

GENÓTIPOS	GENÓTIPOS
01. Catuaí (UFV-2237)	09. Mundo Novo (UFV-2190)
02. Catuaí (UFV-2144)	10. Mundo Novo (UFV-2164)
03. Catuaí (UFV-2147)	11. Mundo Novo (UFV-2150)
04. Catuaí (UFV-2145)	12. Mundo Novo (UFV-2163)
05. Catuaí (UFV-2154)	13. Mundo Novo (UFV-2191)
06. Catuaí (UFV-2155)	14. Mundo Novo 12
07. Catuaí (UFV-2156)	15. Topázio (MG 1190)
08. Catuaí (UFV-2143)	16. Acaiá Cerrado (UFV-1150)

Extração de DNA

O DNA foi extraído de folhas jovens seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro, corrido em gel de agarose 0,8 % e armazenado a 4°C. Na época da amplificação foi diluido em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/µl.

Amplificação de DNA e análise eletroforética dos produtos

Vinte e oito *primers* de 10 bases da "Operon Technologies" foram utilizados para amplificar os DNAs dos 38 genótipos. Dezesseis *primers* foram utilizados para avaliar as 16 linhagens comerciais de café arábica. A amplificação foi feita em termociclador Perkin-elmer 9600 e cada reação contou com um volume total de 25 µl, contendo os seguintes componentes: 25 ng de DNA genômico, 1 unidade AmpliTaq DNA polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 µM de "primer", 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl e 2 mM de $MgCl_2$ e o volume final completado com água ultrapura. Foi utilizado o seguinte programa: um ciclo para desnaturação (95°C por 1 min), 39 ciclos para amplificação (15 seg a 94°C, 30 seg a 35°C, 60 seg a 72°C) e para finalizar 7 min a 72°C. Os produtos das reações de amplificação foram separados em geis de agarose 1,4%, corados com brometo de etídio, visualizados em UV e fotografados. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de bandas. Somente foram consideradas as bandas polimórficas mais nítidas.

Análise dos dados

Foi montada uma matriz de acordo com a presença (1) e ausência de bandas (0). Esta matriz foi usada para calcular as porcentagens de desacordo. O dendrograma foi criado pela análise de clusters do Software STATISTICA usando o método UPGMA ("unweighted pair-group method using arithmetic averages") baseado nas porcentagens de desacordo.

A Figura 1 representa o padrão obtido com o *primer* OPC-09 para 37 genótipos e é apresentado como ilustração.

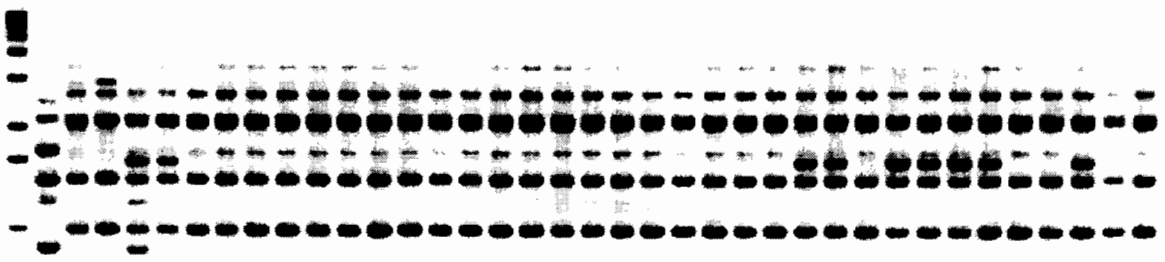


Figura 1 . Padrão de amplificação de DNA obtido com o "primer" OPC-09 para 37 genótipos de cafeeiro. A seqüência partindo da esquerda é a mesma da Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As distâncias genéticas expressas em porcentagens de desacordo obtidas para 38 genótipos de cafeeiro baseadas em 131 marcadores RAPD, variaram entre 0% (entre os genótipos Mundo Novo 2163 e Mundo Novo 2164) e 67% (entre os genótipos *C. racemosa* e Catuaí 2144).

Ao nível de 30% de distância genética, três grupos foram definidos, o grupo A com 1 genótipo (*C. racemosa*), o grupo B com 36 genótipos e o grupo C com um genótipo (*C. canephora*). Portanto, *C. racemosa* foi o genótipo mais divergente e os pares de genótipos Mundo Novo (UFV-2163) e Mundo Novo (UFV-2164), Bourbon de Portugal (UFV-535) e Típica da China não foram separados (Figura 1).

Ao nível de 19,7% o grupo B foi dividido em três subgrupos: B1 com um genótipo (C. congensis), B2 com um genótipo (Triplóide) e B3 com 34 genótipos. Analisando o dendrograma vê-se que os 34 genótipos estão próximos, indicando pouca variabilidade genética no material estudado.

Dos 16 *primers* utilizados para avaliar as 16 linhagens comerciais de café arábica apenas nove geraram bandas polimórficas e apesar da pequena variabilidade em C. arabica, locos polimórficos podem ser utilizados para identificação de linhagens. O dendrograma baseado nas porcentagens de desacordo(Figura 2) mostra que a nível de 27% de distância genética as linhagens foram divididas em quatro grupos e que Acaiá Cerrado é a linhagem mais divergente.

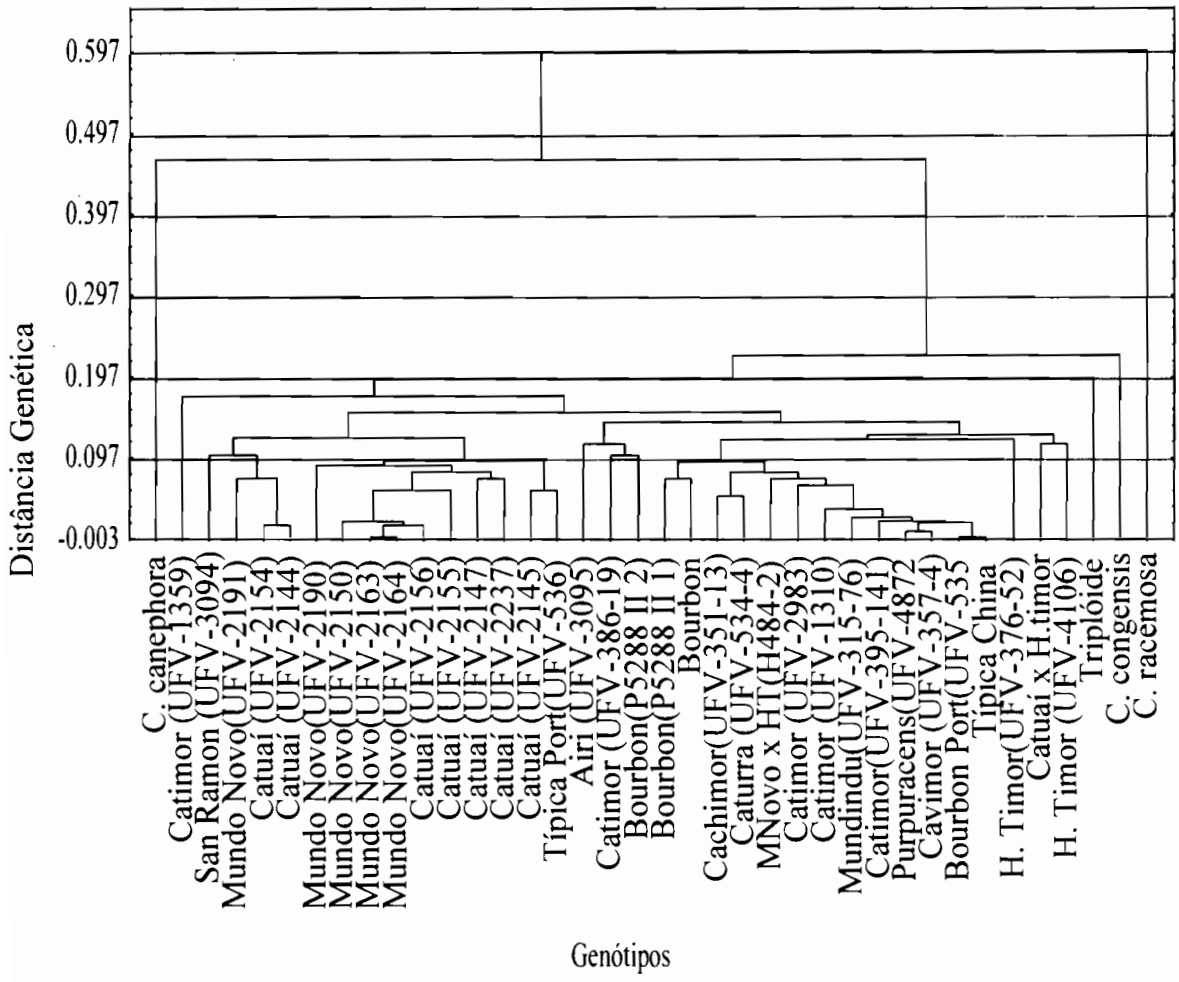


Figura 2 . Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 38 genótipos de cafeeiro baseadas em 131 marcadores RAPD gerados por 28 *primers*.

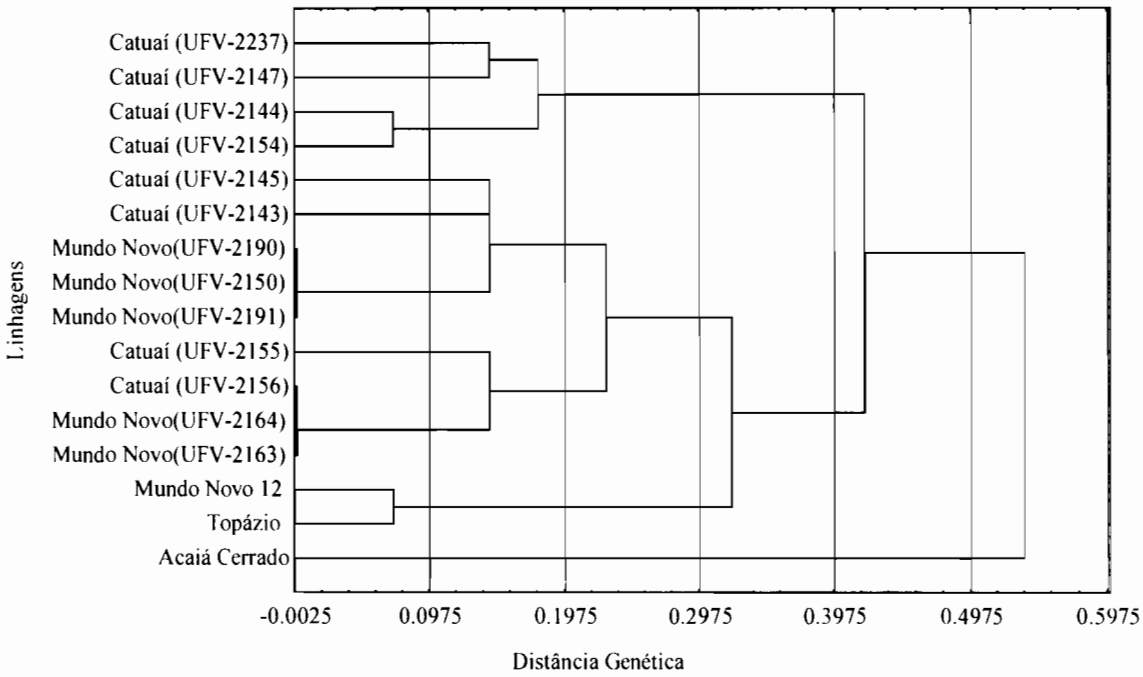


Figura 3 . Dendrograma representando distâncias genéticas estimadas entre 16 linhagens comerciais de *C. arabica* baseadas em 14 marcadores RAPD gerados por 09 *primers*

BIBLIOGRAFIA

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, (1):13-15.

LASHERMES, P.; CROS,J.; MARMEY, P. & CHARRIER, A. 1993. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 40:91-99.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Researchs, 18**(22): 6531-6535.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CAFÉ.

José W. Bustamante P[1] y Delia Polanco L.[2]

[1]Laboratorio de Biotecnología FONAIAP (Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Táchira)
Email:jwbustamante@cantv.net Apartado 5030. Rubio, Táchira, Venezuela
[2]Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela
Email: polancod@camelot.rect.ucv.ve Apartado 4579. Maracay 2110, Venezuela.

RESUMEN

La caracterización electroforética de genotipos se realiza hoy en forma rutinaria en los bancos de germoplasma para identificar con precisión cada material El polimorfismo electroforético de isoenzimas en geles horizontales de almidón (SGE: 12%) fue evaluado en veinte cultivares de café (Coffea arabica L.) pertenecientes al Banco de Germoplasma del Centro de Investigaciones Agropecuarias Táchira (FONAIAP-Táchira, Venezuela). El número de bandas y su distribución en el gel (movilidad relativa) fue similar en los sistemas enzimáticos para cada uno de los individuos por cultivar y en todos los cultivares. Un individuo perteneciente al cultivar Blue mountain fue el único que presentó polimorfismo, mostrando una banda adicional en la enzima ACO (frecuencia del fenotipo electroforético: 1/10 individuos analizados). Se señala además una posible interpretación genética de fenotipos electroforéticos de los diferentes sistemas enzimáticos evaluados, así como una posible teoría sobre ***"HETEROCIGOSIS FIJADA"*** *en la especie Coffea arabica*

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es un rubro de gran importancia a nivel mundial y es cultivado, no por su valor alimenticio sino por el alto contenido de sustancias aromáticas y estimulantes en el grano. Las especies que comercialmente se siembran a nivel mundial son *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex Froehn., las cuales representan alrededor de 70% y 30% de la producción respectivamente. A nivel nacional y en Latinoamérica, la especie que se cultiva en mayor escala es *Coffea arabica*. Ésta se caracteriza por generar una bebida de aroma y sabor suave, mientras que *C. canephora* al igual que las demás especies del género producen una bebida de amargo sabor.

El origen de *C. arabica* no está aún muy definido; sin embargo, *C. arabica* y *C. eugenioides* presentan idéntico genoma mitocondrial. Presumiblemente ésta última, o un pariente cercano, participó como hembra en el posible cruce que dio origen a *C. arabica* (Berthou et al., 1983). Por otro lado, el análisis isoenzimático mostró similitud entre patrones electroforéticos de *C. congensis* y *C. canephora* con la especie *C. arabica*. Es probable que una de estas especies fuera el macho en el posible cruce (Berthou et al., 1980).

La variabilidad conservada en los bancos de germoplasma es necesario caracterizarla e identificarla y esto se ha realizado mediante el uso de características morfológicas, sin embargo, éstas presentan una serie de dificultades y desventajas: altamente influenciadas por el ambiente, expresión tardía en etapas fenológicas, como por ejemplo: características de flor, fruto, etc. (especialmente en aquellas especies de vida juvenil larga (café, cacao, frutales). Actualmente, existen técnicas mas precisas que complementan la caraterización de genotipos; entre éstas se pueden citar: electroforesis de isoenzimas, de proteínas y de ADN (RAPD, RFLP). Las proteínas e isoenzimas, representan la expresión directa de los genes en un ambiente y edad de la planta determinada, mientras que la electroforesis de ADN mide la variabilidad directamente en la cadena de ADN.

El banco de germoplasma de café del Campo Experimental Bramón (FONAIAP- Táchira), es la base de los programas de mejoramiento en este cultivo en el país y cuentan sólo con la caracterización morfológica de las diferentes entradas. En este sentido, se planteó este trabajo con el objeto de caracterizar mediante marcadores moleculares: isoenzimáticos y de proteínas totales, diferentes cultivares de *Coffea arabica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron veinte cultivares existentes en el banco de germoplasma del campo experimental Bramón (CIAE - Táchira, Venezuela) como referencia para este estudio (cuadro 1). Se cosecharon aleatoriamente 50 semillas de cada una de las accesiones, se sembraron en vivero, realizando las labores culturales recomendadas (FONAIAP, 1988) y a los cinco meses de edad, se procedió a la extracción y corrida electroforética de proteínas totales e isoenzimas. Para esto se tomaron cuatro plantas por accesión.

Cuadro 1: Cultivares de *Coffea arabica* analizados

Guadalupe	Typica amarillo	Mundo novo amarillo	Leroy
Bourbón rojo	Semperflorens	Bourbón amarillo	Cera
Villa sarchis	Catimor p-4	Caturra amarillo	Pacas
Purpurascens	Mundo novo rojo	Híbrido de ceilán	Pache
Blue mountain	Híbrido de timor	Híbrido salvadoreño	Bramón I

La extracción de isoenzimas y corrida electroforética se hizo de acuerdo a Bustamante y Polanco (1999), en geles horizontales de almidón (12%) (Shields et al., 1983). En cada gel se colocó un total de veintitrés muestras, de las cuales, tres corresponden al patrón, colocadas una a cada extremo y otra aproximadamente en el centro, con la finalidad de estandarizar la lectura de de los patrones electroforéticos. La tinción se realizó de acuerdo a Vallejos (1983) y las bandas se identificaron en función de su movilidad relativa (m.r), (Laemmli, 1970).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las enzimas estudiadas no presentaron polimorfismo, hecho que imposibilita establecer diferencias entre los cultivares en estudio a través de análisis de taxonomía numérica. Sólo un individuo perteneciente a la variedad *Blue Mountain* presentó polimorfismo en la enzima ACO, mostrando una banda adicional de las dos que aparecen en el resto de individuos analizados.

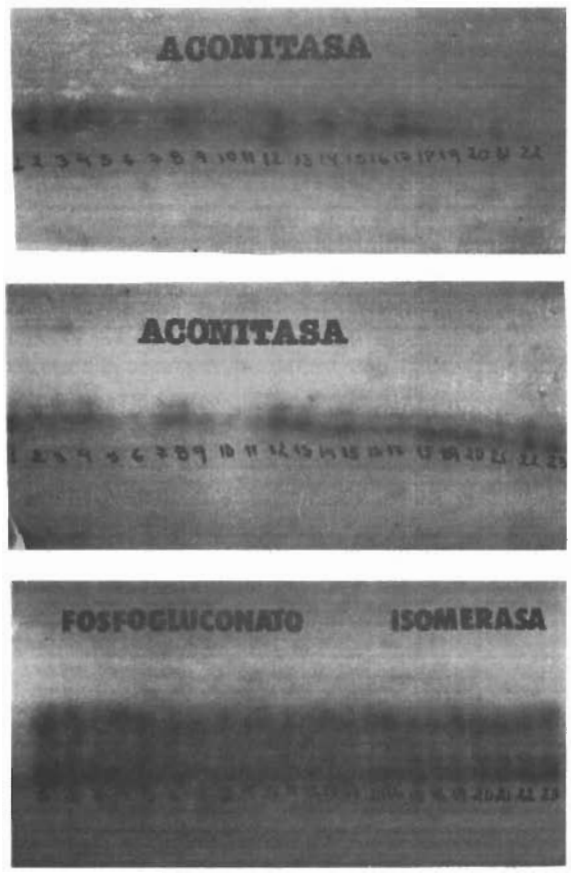
Aconitasa (ACO) E.C. 4.2.1.3

La literatura indica la presencia de 1-3 loci que codifican para un monómero en esta enzima. Sin embargo, los resultados de este trabajo exhiben dos bandas bien definidas en todos los materiales; excepto en un solo individuo de la variedad *Blue Mountain*, el cual presentó polimorfismo (Fig. 1). Pudiera señalarse dos posibilidades para explicar la presencia de las mismas: 1.) La existencia de dos loci en los diferentes cultivares, que corresponden a una enzima en el citosol y otra en la mitocondria (Wendel y Weeden, 1989) y 2.) La existencia de un solo locus con heterocigosis fijada (por la condición tetraploide y enzima monomérica) y por lo tanto se observan dos bandas. La tercera banda que se observa en el individuo de *Blue Mountain*, podría corresponder a un nuevo alelo del locus ubicado a 0.92 de m.r La baja frecuencia de esta banda 0.1 (1/10 individuos muestrados) en dicho cultivar, podría ser producto de una mutación a nivel del individuo en estudio, que no se encuentra en la planta madre, ya que en caso contrario se hubiese observado en más de un individuo. De ser cierta esta suposición, la planta en estudio podría encontrarse en estado heterocigota.

Fosfogluconato Isomerasa (PGI) E.C. 5.3.1.9

En el patrón electroforético presentado por la enzima PGI, se definen dos regiones bien separadas y de marcada actividad (fig 1). Cada una de éstas podría representar un locus diferente, una isoenzima en el citosol y otra en los plastidios (Wendel y Weeden, 1989). La región de menor migración presenta dos bandas bien definidas; aunque la que se ubica a 0.66 de m.r, pareciera que corresponde a dos bandas. De ser así, este locus tendría dos alelos en estado de heterocigosis fijada (enzima dimérica), mientras que el otro locus sería homocigota.

Figura 1: Patrón electroforético de las enzimas Aconitasa y PGI, correspondiente a las 20 accesiones evaluadas



* Valores de movilidad relativa

El nivel de autogamia que presenta *C. arabica*, justifica la poca variabilidad tanto en las características morfológicas como a nivel molecular en todos los individuos de un mismo cultivar, pero entre diferentes cultivares no se esperaría el mismo comportamiento. A nivel interespecífico existe mayor variabilidad, ya que cada una de éstas presentan autoincompatibilidad, lo que las hace alógamas obligadas, permitiendo de esta manera ampliar la variabilidad existente dentro de cada población en cada una de las especies, por tal motivo se detecta polimorfismo isoenzimático (Berthou et al., 1980; Montagnon et al., 1992, 1993; Lopes, 1993).

Como lo señalan Berthou *et al* (1980), los posibes padres de *C. arabica* son muy cercanos geneticamente. En tal sentido, posiblemente presentan algunos loci de isoenzimas idénticos y el híbrido interespecífico (estéril) presenta un juego cromosómico correspondiente a cada uno de los padres; al duplicarse, restaurando de esta manera la fertilidad; sus gametas constarán con el juego cromosómico correspondientes a cada uno de los padres, llevando los dos alelos que aportó cada uno de los padres, lo que genera patrones electroforéticos en condición de heterocigosis fijada.

REFERENCIAS

Berthou, F., Manthieu, C. and Vedel, F. (1983). Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 65: 77-84.

Berthou, F., Trouslot, P., Hamon, S., Vedel, F. and Quetier, F. (1980). Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers. Café Cacao Thé. 24(4): 313-326.

Bustamante, J. y Polanco, D. (1999). Extracción y corrida electroforética de proteínas totales e isoenzimas de café (*Coffea arabica* L.). En publicación.

Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (1988). Paquete Tecnológico para la Producción de Café. Serie de Paquetes Tecnológicos. Maracay, Venezuela. N° 6. 192 pp.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriphage T4. Nature 22: 680-685.

Lopes, C. 1993. Phylogenetic studies of some species of the genus *Coffea*. II- Numerical analysis of isoenzymatic data. Rev. Brasil. Genet. 16(2): 393-407.

Montagnon, C., Leroy, T. and Yapo, A. (1992). Diversité génotypique et phénotypique de quelques groupes de caféiers (*Coffea caephora* Pierre) en collection. Café Cacao Thé. 36(3): 187-198.

Montagnon, C., Leroy, T. and Yapo, A. (1993). Caractérisation et evaluation de caféiers *Coffea canephora* prospectés dans des plantations de Cote-D'Ivoire. Café Cacao Thé. 37(2): 115-119.

Shields, C., Orton, T. and Stuber, W. (1983). An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. En S. Tanksley y T. Orton. (Eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. 443-468. Elsevier Sci. Publi. B. V. Amsterdam.

Vallejos, E. (1983). Enzyme activity staining. En S. Tanksley y T. Orton. (Eds.). Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. 469-516. Elsevier Sci. Publi. B. V. Amsterdam.

Wendel, J. and N. Weeden. (1989). Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. En: D. Soltis, and P. Soltis (eds.). Isozymes in Plant Biology. 5-45. Dioscorides Press, Portland.

MAPEAMENTO DE GENE DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM-DO-CAFEEIRO (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) COM MARCADOR RAPD

Nara S. Tedesco[1,2]; Ney S. Sakiyama[1,2]; Laércio Zambolim[1,3]; Terezinha A. Teixeira[1,2]; Antônio A. Pereira[4]; Cássia C. H. Sakiyama[1]

[1]BIOAGRO/UFV; [2]DFT/UFV; [3]DFP/UFV; [4]EPAMIG. 36571-000 Viçosa,MG.Apoio Financeiro: FAPEMIG, FINEP, CNPq, PNP&DCafé

INTRODUÇÃO

A ferrugem-do-cafeeiro é um problema que afeta mundialmente a cultura do café, resultando numa queda de cerca de 35% da produção. O fungo causador da ferrugem-do-cafeeiro, ***Hemileia vastatrix*** Berk. et Br., é parasita obrigatório, facilmente disseminado, principalmente pelo vento. Ao entrar em contato com o hospedeiro, sob condições favoráveis, como temperatura entre 21°C e 23°C e na ausência de luz, germina, penetra e se multiplica neste. Os sintomas e sinais são facilmente identificados pois este fungo forma uma 'massa' de esporos alaranjada (uredosporos) na face abaxial da folha, enfraquecendo a planta e podendo levá-la à morte.

Após a disseminação do fungo, muitos trabalhos já foram realizados visando obter dados mais aprofundados sobre suas causas, formas de controle e tentativas para se obter cultivares resistentes. Acredita-se que o uso de variedades resistentes é o método mais eficaz e econômico.

PEREIRA (1995), estudou a herança da resistência às raças fisiológicas II e XXV de ***Hemileia vastatrix*** Berk. et Br. em sete combinações resultantes de hibridações do Híbrido de Timor com cafeeiros das cultivares Catuaí e Mundo Novo. Os resultados analisados mostraram que a resistência a este fungo, nos descendentes de uma das introduções, é conferida por três genes de segregação independente e com dominância completa, e na descendência da outra introdução é controlada por um único gene com dominância completa.

Diante dos resultados obtidos neste e em outros trabalhos, ficou destacado o elevado nível de resistência a ***H. vastatrix*** nas populações derivadas do Híbrido de Timor. Essa e outras características de interesse, aliadas à alta capacidade produtiva observada, em condições de campo, para as populações derivadas do Híbrido de Timor, ressaltam o potencial desse híbrido, para o melhoramento genético do cafeeiro, visando à obtenção de cultivares resistentes à ferrugem (PEREIRA,1995).

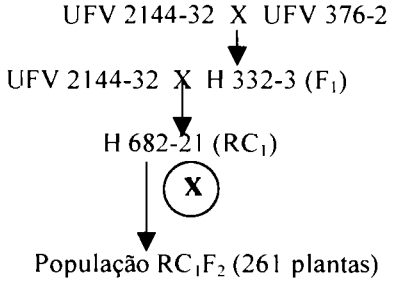
O presente trabalho teve como objetivo o mapeamento de gene de resistência à ferrugem-do-cafeeiro com marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990).

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

A população utilizada no presente trabalho, é proveniente do cruzamento interespecífico entre UFV 376-2 (Híbrido de Timor - material recebido do CIFC, em Portugal) e UFV 2144-32 (Catuaí Vermelho - do Campo EP 20.1) do qual surgiu H 332-3 (híbrido F1 – do campo de seleções de híbridos da UFV). Após obtenção do híbrido F_1, o mesmo foi utilizado num retrocruzamento com UFV 2144-32, originando a planta H 682-21. Uma população de 261 plantas RC_1F_2, obtida por autofecundação de H 682-21 foi avaliada em condições de Câmara de crescimento apresentando uma proporção 3:1 em relação resistência: suscetibilidade à ferrugem-do-cafeeiro.

População F_2



Extração de DNA

O DNA foi extraído de folhas jovens seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990) com a adição de PVP-40 (solúvel) no tampão de extração. Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro, corrido em gel de agarose 0,8 % e armazenado a 4°C. Na época da amplificação foi diluido em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para uma concentração final de 10 ng/µl.

Preparo de bulks de DNA para identificação de marcadores RAPD

A análise de mistura de segregantes (*BSA–Bulk Segregant Analysis*), é um método rápido de

identificação de marcadores ligados a uma região específica do genoma (MICHELMORE et al., 1991).

De uma população segregante F_2, 10 plantas resistentes e dez plantas suscetíveis foram selecionadas para respectiva produção de *bulk* de DNA, sendo assim cada *bulk* constituído por indivíduos idênticos para a característica de resistência (ou suscetibilidade) à ferrugem. De cada amostra de DNA das plantas escolhidas, foram adicionados em um novo tubo 100 µL, possuindo cada um dos dois *bulks*, ao final do preparo, 1000 µL de mistura de DNA numa concentração de 10 ng/mL em TE. Para composição do *bulk R* (resistente) foram selecionadas as plantas que apresentaram mais elevado nível de resistência a ***H. vastatrix*** de acordo com avaliação em casa de vegetação e para compor o *bulk S* (suscetível) as plantas que apresentaram mais elevado nível de infecção pelo fungo. Os dois *bulks* de DNA foram usados para amplificação dos fragmentos com a finalidade de se identificar marcadores ligados aos fatores de resistência do doador, utilizando-se vários primers tomados ao acaso.

Amplificação de fragmentos de DNA para obtenção de marcadores RAPD

Cento e vinte e cinco primers de 10 bases, foram utilizados na amplificação dos fragmentos de DNA na tentativa de encontrar marcadores polimórficos entre os dois *bulks*. Cada reação obteve os seguintes componentes: 2,5 µL de KCl 50 mM; 2,5 µL de TRIS-HCl 10 mM; 2,0 µL de MgCl2 2 mM; 1,25 µL de dNTPs 100 µM; 1,0 µL de primer; 0,2 µM; 1,0 µL de Taq DNA polimerase 1 U e 2,5 µL de DNA 25 ng, somando um total de 25 µL por reação ao completar o volume com água ultra pura. A amplificação foi efetuada em termociclador Perkin Elmer 9600 programado para: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C, e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

Análise por eletroforese dos fragmentos amplificados e visualização

A separação dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,2% a 100 V por 3 horas. Após a eletroforese os fragmentos amplificados foram corados em uma solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) por 30 minutos e, em seguida, a solução foi substituída por água para eliminar, durante uma hora, o excesso do produto. O padrão molecular foi visualizado sob luz ultra-violeta e fotodocumentado.

Análise de co-segregação

Primers apresentando banda polimórfica entre os *bulks* S e R foram utilizados para a análise de co-segregação na população segregante para a confirmação da ligação gênica existente entre os marcadores e o gene de resistência à ferrugem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 125 *primers* testados 14 resultaram em bandas polimórficas entre os *bulks* R (plantas resistentes) e S (plantas susceptíveis). A Figura 1 mostra o polimorfismo apresentado entre os *bulks* com a utilização do primer OPC-09.

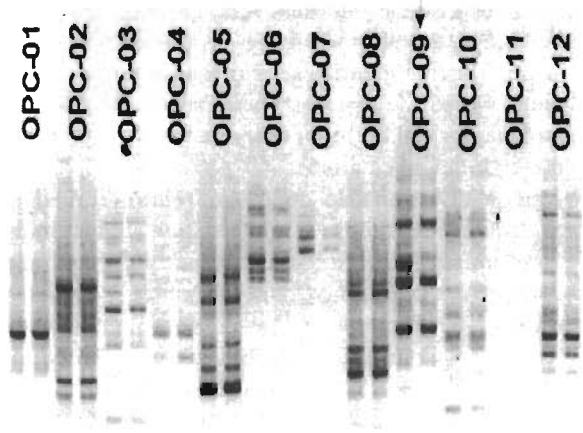


Figura 1- Marcadores RAPD em bulks de cafeeiros resistentes (R) e *bulks* susceptíveis (S). A seta indica marcador polimórfico entre bulk R e S.

Dos 14 primers apresentando bandas polimórficas entre os *bulks* R e S, quatro foram selecionados para análise preliminar de co-segregação utilizando-se as 20 plantas individuais pertencentes aos bulks R e S .

Da amplificação dos quatro primers selecionados para análise de co-segregação de 20 plantas, dois primers apresentaram polimorfismo; ambos resultaram em dois recombinantes em 20 plantas. A análise de co-segregação na população de 80 plantas foi efetuada com o *primer* OPC-09 por apresentar melhor nitidez de bandas (Figura 2).

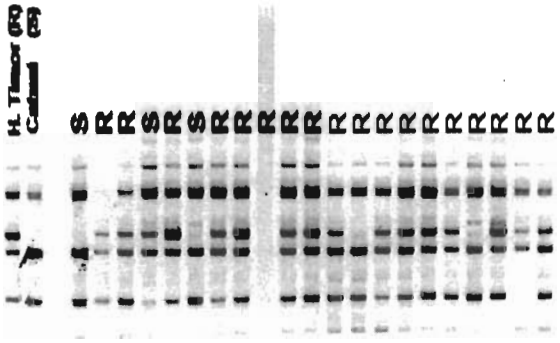


Figura 2- Marcador RAPD obtido pelo primer OPC-09 apresentando co-segregação com a reação de resistência (R) e susceptibilidade (S) à ferrugem-do-cafeeiro.

Pela análise de co-segregação, concluiu-se que o marcador RAPD obtido com o primer OPC-09 encontra-se ligado ao gene de resistência à ferrugem-do-cafeeiro, com a distância estimada de 9,6 cM. Este trabalho continua em execução com o objetivo de se encontrar outros marcadores mais próximos ao gene de resistência. Outra população apresentando resistência condicionada por dois genes também encontra-se em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus, 12**, (1):13-15.

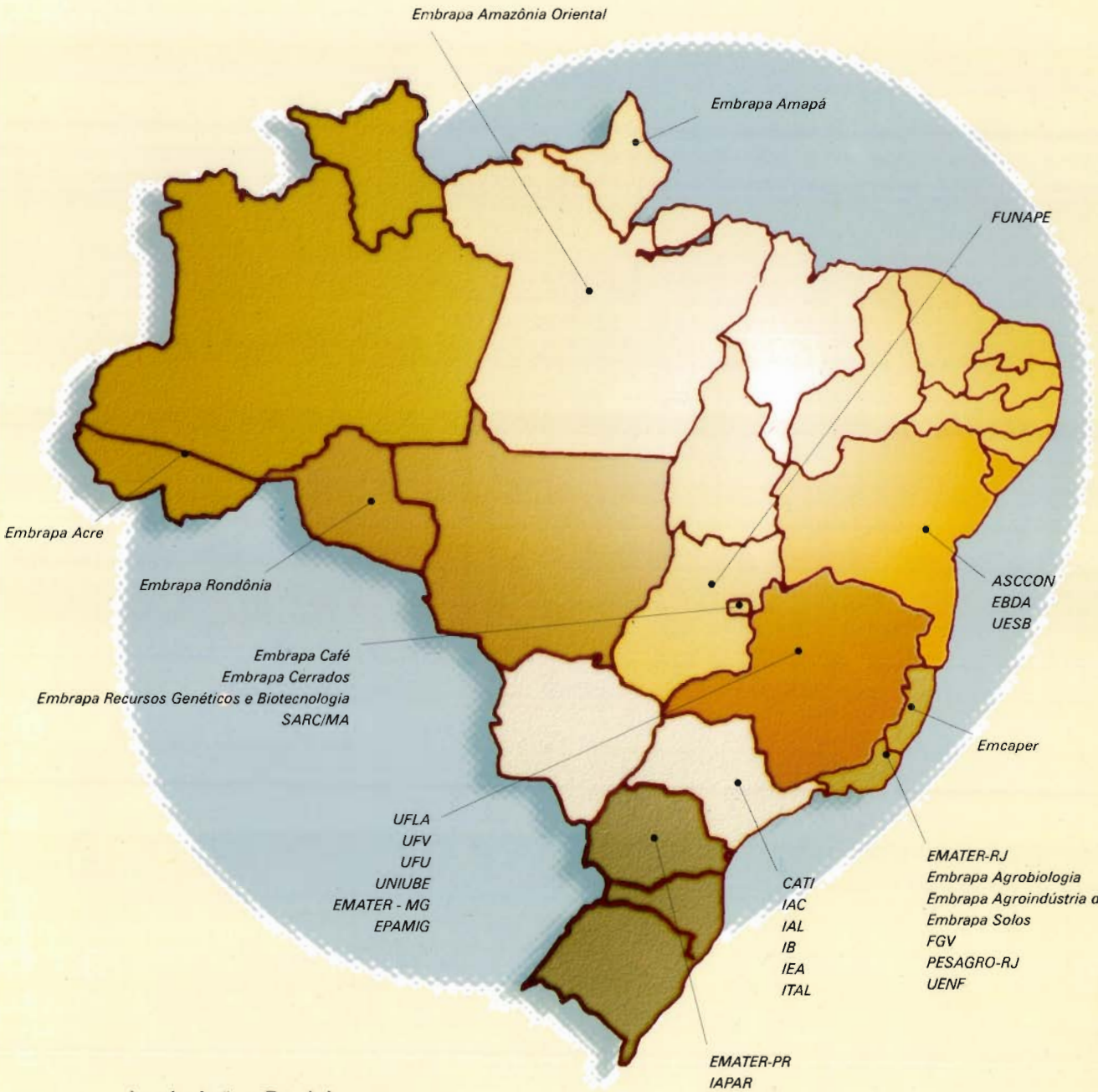
MICHELMORE, R. W., PARAN, I. & KESSELI, R. V. 1991. Identification of Markers linked to diasease resistence genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregant populations. **Proc. Natl Acad. Sci., 88**: 9828-32.

PEREIRA, A. A. 1995. **Herança da Resistência a Hemileia vastatrix Berk et Br em Cafeeiros Derivados do Híbrido de Timor**. Viçosa, MG, UFV, 66p (Tese M. S.).

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Researchs, 18**(22): 6531-6535.

Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café

Coordenação Embrapa



Instituições Participantes
por Unidade da Federação

BIOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES NUM MENOR PRAZO NO "MODELO IAPAR DE CAFÉ ADENSADO"

Tumoru Sera

Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR/Programa Café. Rod. Celso Garcia Cid, km375, C.P.481 - CEP86001-710, Londrina, Paraná, Brasil

1-INTRODUÇÃO

O melhoramento genético do cafeeiro, especialmente para a produção, não tem sido fácil. Isto se deve à existência do período juvenil, à necessidade de se avaliar vários anos de produções consecutivas para se conhecer a capacidade produtiva a longo prazo e à existência da acentuada oscilação anual de produção onde o cafezal é conduzido a pleno sol e sem sombra (SERA, 1987). Apesar disso, os programas de melhoramento executados em vários centros de pesquisa tem levado a grandes progressos genéticos. O programa iniciado em 1933 no Instituto Agronômico de Campinas obteve progressos de até 240% quando se comparou a cultivar Mundo Novo em relação a primeira cultivar plantada no Brasil, Árabica (FONSECA, *et al.* 1978). Os métodos de melhoramento normalmente empregados no Brasil, consistem na seleção de plantas individuais seguida da avaliação de progênies, ou ainda de hibridação intra e interespecífica e seleção genealógica. Em adição, o método de retrocruzamento tem sido aplicado para a transferência de caracteres específicos, tais como internódios curtos e resistência a pragas e doenças, presentes em outras cultivares ou em espécies relacionadas a *Coffea arabica* L.. A seleção de plantas individuais pode ser realizada tanto em uma plantação comercial, como em parcelas experimentais especialmente plantadas com o propósito de melhoramento genético. Neste último caso, a produção é registrada por vários anos sucessivos para a identificação de genótipos superiores (MEDINA *et al.*, 1984).

O conhecimento profundo do ambiente de cultivo, processamento, comercialização e consumo é de fundamental importância no desenvolvimento de cultivares de sucesso. O ambiente de uso destes cultivares em foco, tomado como exemplo na apresentação do tema é dentro do "Modelo tecnológico para a produção de café no Paraná" ("Modelo IAPAR de café adensado"). Consiste resumidamente do seguinte:

- Modelo de produção constituído por mais de 75 tecnologias;
- Espaçamento de plantio adensado entre 8 e 12 mil plantas/ha;
- Produtividade potencial na propriedade ótima em torno de 80sc.b./ha/ano;
- Lucro de 50 em 10 ha, pela eficiência (produtividade, qualidade, menor custo/sc);
- Criação de 1 emprego a cada ha de café ao custo de US$5000 / ha;
- Trabalhadores produtivos e qualificados como solução;
- Reativação econômica em mais de 200 municípios cafeeiros do Paraná;
- Adequação a micros, pequenas, médias e grandes propriedades;
- Retorno inicial de investimento com 2,5 anos do plantio;
- Estabilidade econômica com diversificação integrada e moderada na propriedade;
- Plantio parcelado anual (4 a 10 anos), semestral e trimestral no ano;
- Adoção gradual e contínua de novas tecnologias e cultivares;
- Independência em relação a financiamentos;
- Adequação a produtores descapitalizados;
- Tecnologia ecológica com manejo de solo, pragas e doenças;
- Convivência com os nematóides através do manejo integrado de medidas de controle;
- Custo menor de adubação/saca, com manejo do solo e da nutrição do cafeeiro;
- Convivência com as geadas recuperando-se após uma safra de descanso;
- Manejo varietal regional, local e topo-climática, adaptado a clima e solo específicos;
- Colheita escalonada usando 4 grupos de variedades, desde precoce até super-tardia;
- Café de qualidade a baixo custo, com o uso de tecnologias simples;
- Café é uma necessidade para o trabalho urbano e o consumo está em ascensão.

O principal objetivo é tornar forte a cafeicultura paranaense dentro do "PLANO CAFÉ DO PARANÁ" aumentando a RENTABILIDADE e a ESTABILIDADE econômica dos CAFEICULTORES, através da eficiência produtiva ao nível da propriedade. A eficiência produtiva será alcançada com base em:

1) Aumento da produtividade;
2) Redução do custo de produção por saca;
3) Melhoria da qualidade do produto;
4) Diversificação agrícola integrada na propriedade.

O melhoramento genético do cafeeiro se dará dentro deste ambiente de cultivo selecionando e desenvolvendo cultivares que auxiliem de alguma forma nos objetivos e estratégias do "Plano Café do Paraná".

2. NECESSIDADES DE MELHORAMENTO GENÉTICO NO CAFEEIRO

Para alcançar a eficiência na produção de café de qualidade a menor custo há necessidade de desenvolver vários projetos de pesquisa:

- Potencial de produtividade de 80 sc.b./ha/ano para produtores ótimos não está acessível para a maioria, necessitando amenizar vários pontos de estrangulamentos através de variedades e seu manejo adequado;
- A realização do potencial de produção de café de qualidade está tendo várias dificuldades, necessitando uniformizar a maturação, escalonar a colheita e desenvolver cultivares de grãos maiores;
- Dentre os componentes do custo de produção, a colheita é o componente mais oneroso, tanto de plantio tradicional como de adensado, necessitando escalonar a colheita e desenvolver cultivares de porte pequeno de fruto graúdo;
- A vulnerabilidade a oscilações ambientais é alta, necessitando de cultivares menos suscetíveis a geada, a seca e a solo pobre;
- Controle de ferrugem está difícil em espaçamentos adensados, onerando o custo e depreciando a qualidade e, com isso, aumentando a suscetibilidade às geadas, necessitando desenvolver novas variedades com mais genes de resistência e tolerância, mais adaptados para este sistema de cultivo;
- Nematóide, especialmente *Meloidogyne incognita* com as suas 5 raças fisiológicas conhecidas é limitante na propriedade infestada, necessitando intensificar o desenvolvimento de porta-enxertos resistentes e cultivares pés francos resistentes;
- A bacteriose *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* está se tornando uma doença limitante em regiões de altitude e em faces sul e leste necessitando desenvolver cultivares resistentes;
- Bicho mineiro está se tornando mais danoso e de controle difícil necessitando intensificar o desenvolvimento de cultivares resistentes;
- Alto custo de controle das ervas daninhas no café em formação justifica o desenvolvimento de cultivares resistentes a herbicidas;
- Há necessidade de se precaver da introdução de antracnose dos frutos e iniciar os trabalhos de avaliação da resistência do germoplasma disponível;
- Controle de broca com incorporação do gene BT é necessária;
- Há necessidade de reduzir o tempo gasto no desenvolvimento de cultivares.

3. REDUÇÃO NO TEMPO GASTO PARA OBTENÇÃO DE CULTIVARES DE CAFÉ

Os métodos de melhoramento genético de plantas utilizados normalmente em espécies anuais podem ser utilizados em cafeeiro, plantas perene, desde que respeitadas as suas características. Contudo, o melhoramento de plantas perenes como o cafeeiro apresenta algumas particularidades muito importantes, necessitando adotar procedimentos especiais para não ter um programa de melhoramento de baixa eficiência:

- Períodos normalmente mais longos para que se obtenha as flores para a realização dos cruzamentos e para a produção de sementes.
- Uma importância relativamente maior de se avaliar bem as características agronômicas, não somente a produtividade e a qualidade, antes da recomendação, devido ao custo relativamente alto de substituição das cultivares.
- Custo alto da avaliação de campo devido a necessidade de maiores áreas e tempo para experimentação.
- Necessidade de avaliação da precocidade e longevidade produtiva.
- Necessidade de avaliação da oscilação anual da produção.
- Florescimento e produção anual sobre a mesma planta.

4. GANHO GENÉTICO ANUAL NA SELEÇÃO EM CAFÉ

Estas características limitam a adoção de alguns métodos de melhoramento normalmente utilizados em cultivos anuais de forma clássica. A conseqüência destas características é uma menor eficiência de um programa de melhoramento de uma espécie perene, se adotar os mesmos procedimentos correntes adotados para as plantas anuais. Esta baixa eficiência, é medido pelo baixo ganho genético da seleção por

ano. A seguir será definido e comparado pela expressão do ganho genético por ano (G.S.a) até a obtenção de cultivares em plantas anuais e perenes propagadas sexuada ou assexuadamente.

$$\textbf{G.S.} = (\textbf{D.S.} \times h^2) \div (F_n \times \textbf{Anos por ciclo})$$

Onde,
G.S. = ganho genético anual;
D.S. = diferencial de seleção;
h^2 = Herdabilidade = Variância genética (σ^2 G) ÷ Variância fenotípica (σ^2 F);
F_n = número de gerações de seleção necessárias para obtenção de cultivares.
Plantas anuais. A h^2 depende do esquema seletivo, e geralmente conduzem um ciclo de seleção por ano repetindo várias gerações.

$$\textbf{G.S.a.Anuais} = \textbf{D.S.} \times \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_F} \div F_n$$

Onde,
σ^2_G = variância genética;
σ^2_F = variância fenotípica

Cultivar de café tipo clone. Se o cafeeiro for propagada vegetativamente, a $\sigma^2_G = \sigma^2 a + \sigma^2 d + \sigma^2 i$ e então o ganho genético esperado por ano seria:

$$\textbf{G.S.a.Clonais} = \textbf{D. S.} \times \frac{\sigma^2 a + \sigma^2 d + \sigma^2 i}{\sigma^2 a + \sigma^2 d + \sigma^2 i + \sigma^2 e} \div \textbf{Anos por ciclo}$$

σ^2 **a** = Variância genética aditiva;
σ^2 **d** = Variância genética dominante;
σ^2 **i** = Variância genética epistática;
σ^2 **e** = Variância ambiental.
Ou seja, toda a σ^2_G poderia ser aproveitada e, a partir da obtenção de um genótipo superior, geralmente heterozigótica, estas caracteristicas favoráveis seriam transmitidas vegetativamente para as gerações posteriores, resultando em G.S. maior do que as cultivares propagadas por semente devido ao h^2 maior e F_n= 1.

Cultivares de café tipo linhagem propagadas por sementes. Já em plantas propagadas por sementes e visando a obteção de genótipos homozigotos na maioria dos loci, o **G.S.** seria:

$$\textbf{G.S.a.Linhagem} = \textbf{D.S.} \times \frac{\sigma^2 a}{\sigma^2 a + \sigma^2 d + \sigma^2 i + \sigma^2 e} \div (\textbf{Anos por ciclo} \times F_n)$$

Ou seja, apenas a σ^2**a** poderia ser aproveitada neste caso e, necessariamente, teríamos que conduzir as populações obtidas por algumas gerações até obter níveis de homozigose que pertimissem fixar as características favoráveis, resultando em G.S. muito menor que as propagadas vegetativamente ou a obtida em plantas de ciclo anual.
Assim, torna-se evidente que dependendo da forma de propagação do cafeeiro e do tipo de cultivar que se pretende obter, pode-se necessitar de maior ou menor tempo para a obtenção de genótipos superiores que possam ser utilizados comercialmente pelos produtores. A adoção de algumas estratégias especiais no melhoramento genético do cafeeiro pode reduzir muito o tempo gasto no desenvolvimento de novas cultivares, além de possibilitar uma grande redução da área experimental, resultando em grande economia e aumento substancial na eficiência do programa de melhoramento.
A redução do número de anos e do número de gerações, ou seja, a redução no tempo gasto para se chegar a uma nova cultivar é o ponto chave para aumentar a eficiência ou o progresso genético no melhoramento genético do cafeeiro.

5. REDUÇÃO DO TEMPO GASTO NO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES DE CAFÉ

No desenvolvimento de cultivares, a redução do tempo gasto em uma geração ou ciclo de seleção ou na obtenção de cultivares é de fundamental

importância para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento, onde é comum começar a florescer somente após 2 ou até mesmo mais anos após a semeadura (SERA, 1987). Muito freqüentemente é fator limitante no desenvolvimento de um projeto de melhoramento genético, num prazo razoável.

Além disso, uma das características desejáveis na cultura de café é que comece a produzir mais cedo e, ao mesmo tempo, continue produzindo por mais tempo. Para isso, é necessário avaliar a produção durante a vida útil produtiva da planta ou da progênie para dizer com segurança que tal seleção apresenta esta característica. Para os cultivos em que o produto comercial é semente, o problema é maior, pois, antes de iniciar a produção, existe o período juvenil, pré-reprodutivo.

Após o período juvenil, um único ensaio ou campo de seleção exige muitos anos de observações durante a qual a área experimental não pode ser aproveitada para outros fins. Desta maneira, muito espaço, tempo e recursos são consumidos, enquanto que o número de plantas que podem ser mensurados são limitados.

Assim, a possibilidade de se conduzir um programa de melhoramento genético racional de cafeeiro envolvendo múltiplos objetivos utilizando, por exemplo, um esquema de retro-cruzamento, de seleção recorrente ou de um genealógico, depende grandemente da redução do número de gerações ou ciclos de seleção e de se efetuar a seleção antecipada para produção com menor número de anos por geração. Outras características menos complexas como resistência a pragas, doenças e adversidades ambientais podem ser avaliados e selecionados durante o período juvenil (SERA, 1984).

Os melhoristas de plantas estão constantemente tentando identificar novos procedimentos que possam aumentar a eficiência no desenvolvimento de cultivares. A eficiência de estratégias alternativas no melhoramento de plantas perenes pode ser avaliado em termos da quantidade de ganho genético realizado por ano (G.S.a).

G.S.a é estimado pela incremento na performance média de uma progênie que é realizada em cada ciclo. Um ciclo de seleção inclui o estabelecimento de uma população segregante, desenvolvimento de genótipos, avaliação de genótipos, seleção dos genótipos superiores e utilização dos genótipos selecionados como parental para formar uma nova população para um novo ciclo de seleção. O tempo consumido em cada ciclo de seleção pode variar consideravelmente. Na comparação de estratégias alternativas, o **G.S.** precisa ser expresso em base anual. O melhorista precisa traçar estratégias que utilizem racionalmente os recursos humanos, espaço, material e tempo disponíveis para propiciar o maior ganho possível por ano.

Para as plantas perenes como cafeeiro existem procedimentos, métodos e técnicas alternativas em que o tempo gasto e o número de plantas a serem avaliados no campo durante o processo de obtenção de cultivares podem ser reduzido drasticamente:

1. Redução do período juvenil;
2. Seleção no período juvenil;
3. Seleção antecipada para produção nos anos iniciais;
4. Seleção em gerações precoces;
5. Métodos que não avaliam a produção (população, SSD e retro-cruzamento);
6. Uso de técnicas biotecnológicas e engenharia genética;
7. Obtenção de cultivares duplo-haplóides;
8. Uso da heterose de cultivares híbridas F_1, F_2 e sintéticas;
9. Propagação vegetativa para uso de cultivares do tipo clone;
10. Lançamento antecipado de cultivares.

Cada um dos métodos, técnicas e procedimentos disponíveis para o desenvolvimento de cultivares apresentam vantagens e desvantagens. A probabilidade de obtenção de uma cultivar superior pode ser aumentado pela elevação no número de genótipos que podem ser testados a cada ano, porém com aumento de custos que precisam ser minimizados por estratégias alternativas, usando técnicas e procedimentos especiais, junto com métodos de melhoramento apropriados para plantas perenes. Estratégias apropriadas que possibilitem o rápido avanço de gerações como a clonagem, duplo-halóides e lançamento antecipado de cultivares podem ter grande impacto na eficiência de um programa de melhoramento de plantas perenes como o cafeeiro.

5.1. Redução do período juvenil

Em geral, um projeto de obtenção de cultivares envolve várias gerações de seleção. Consequentemente, o comprimento de uma geração de reprodução é muito freqüentemente o fator limitante para encerrar um projeto num prazo razoável.

a) Seleção para genótipos de florescimento precoce. Ocorre no cafeeiro da mesma forma como ocorre em outras plantas perenes como em macieira, pereira, videira, figueira e citrus.(JANICK & MOORE, 1975; SERA, 1985).

b) Semeadura imediata após a colheita. É comum a espera de condições de temperatura natural ideal para a semeadura. Usando-se germinação em condições controladas e a plasticultura no inverno, pode-se ganhar 6 meses no caso do cafeeiro. No cafeeiro, se conseguir plantar no campo em outubro pode ganhar um ano agrícola do café. Se plantar em abril-maio já terá perdido um ano a mais por ciclo (SERA, 1984).

c) Boas condições de cultivo. Tanto no viveiro como em campo, adubação, irrigação, temperatura, controle de invasoras e parasitas, luminosidade, etc., em condições próximas do ideal podem reduzir o período juvenil (JANICK & MOORE, 1975; SERA, 1984), o mesmo ocorrendo em cultivo *in vitro* (SÖNDHAL et al, 1981) ou em campo (MÔNACO *et al.*, 1978).

d) Porta enxerto-ananizante. A enxertia por garfagem de plântulas ou borbulhas de gemas vegetativas de plantas perenes lenhosas em porta enxertos fracos, velhos ou ananizantes tem sido freqüentemente indicada, como no caso de macieira, podendo reduzir o período juvenil para menos da metade do tempo. Enxertia por garfagem de plântulas de perenes lenhosas em porta enxerto fraco ou ananizante é uma técnica freqüentemente aplicada como em macieira (JANICK & MOORE, 1975), podendo ser tentada em cafeeiro.

e) Indução floral ambiental. A deficiência hídrica pode induzir a redução do tempo de florescimento até a maturação. A deficiência de nitrogênio durante o enchimento dos grãos leva a sementes pequenas e de maturação precoce. O aumento do teor de fósforo tende a reduzir o período de maturação.. A exposição contínua de luz é o meio apropriado de reduzir o tempo de florescimento de plantas de dias longos. Para plantas de dias curtos o mais adequando é uma menor exposição a luz mas, o efeito de dias curtos depende do fotoperíodo ótimo. Para as plantas tropicais podem ser mais apropriados o dia de 8 horas (WELLENSIEKI, 1962). A temperatura alta reduz o tempo entre o florescimento e a maturação dos frutos no cafeeiro (SERA, 1979) permitindo a semeadura em maio e plantio no campo em outubro.

5.2. Avaliação e seleção juvenil para produtividade

A seleção juvenil para produtividade pode ser praticada para as características qualitativas e quantitativas de alta herdabilidade, altamente correlacionadas com a produção. A seleção pode ser feita no estádio de plântulas, mudas no viveiro ou em campo, antes da ocorrência da primeira produção.

a) Seleção em plântulas. Características como volume radicular e vigor vegetativo podem ser selecionadas desde o estádio de folha cotiledonar até algumas folhas definitivas, antes do transplante para o recipiente de mudas, reduzindo muito o custo.

b) Seleção em mudas no viveiro. Características como a resistência a insetos, doenças, nematóides, seca, alumínio e geada podem ser selecionadas junto com outras características correlacionadas com a produção antes de serem levadas para o plantio em local definitivo, economizando espaço no campo e tempo gasto na avaliação e manuseio dos dados, liberando mais espaço, recursos e tempo para materiais mais valiosos.

c) Seleção juvenil no campo. Características como ramificação, diâmetro da planta, resistência ao vento, resistência a temperaturas extremas e número de flores por axila podem ser selecionadas nas condições de campo, antes de se realizar a primeira colheita. Pode-se plantar 3 ou mais plantas por cova e selecionar apenas uma. Com base em avaliações de campo, pode-se eliminar alguns tratamentos por evidente inferioridade agronômica, aumentando a eficiência da seleção e economizando tempo e recursos.

5.3. Seleção antecipada para produtividade e uso de índice de seleção

Produtividade é uma característica quantitativa difícil de ser trabalhada em programas de desenvolvimento de cultivares que incorporam novas características como resistência aos parasitos, a adversidades ambientais e mudança no sistema de cultivo ou de exigência de novas qualidades pelos consumidores.

A compreensão dos componentes da produção e

suas correlações podem auxiliar na seleção antecipada dos genótipos promissores para produtividade. São comuns correlações negativas entre número e tamanho dos grãos, entre produção de folhas e sementes, entre tamanho de plantas e número possível de plantas por área, etc. (GIFFORD & EVANS, 1981).

Em plantas perenes, onde uma vez iniciada a produção, a mesma planta produz por vários anos, usualmente por 10-20 anos, a produção inicial pode não representar a produção total. Assim, podem existir genótipos que apresentam precocidade de produção, isto é, produção inicial maior, e menor longevidade de produção, isto é, senescência precoce, enquanto que podem existir genótipos com produção tardia e longevidade de produção. O genótipo ideal seria aquele que começa a produzir cedo com alta produtividade e se mantêm produtivo por um período maior de tempo. Assim, é necessário e possível um sistema de avaliação antecipado da produção futura que garanta um avanço rápido em cada geração de seleção resultando em obtenção mais rápida de um novo cultivar **(QUADRO 1)** com maiores progressos genéticos.

5. 4. Índice de seleção

A identificação antecipada de genótipos mais produtivos com maior precisão do que a alcançada usando-se apenas a produção dos anos iniciais, é altamente desejável no melhoramento genético do cafeeiro. Segundo MEDINA *et al.* (1984), cultivares de sucesso devem começar a produzir cedo e manter produções altas por mais anos. As melhores progênies podem ser escolhidos com base nas seis primeiras produções consecutivas para representar 15 a 20 anos de produções (CARVALHO, 1952; FAZUOLI, 1977; CARVALHO *et al.*,1985). Entretanto, a obtenção de produções num tal período de tempo, para uma cultura perene arbustiva que começa a produzir somente após três anos de período vegetativo ainda é consumidora de tempo, além de ser consumidora de espaço e recursos. O coeficiente de determinação (R^2) indica o porcentual em que a produção real é estimada pela equação de regressão múltipla. SERA (1987) usando a regressão múltipla estimou estes coeficientes para um índice de seleção composto por características mensuráveis nos 3 primeiros anos de produção. Ao usar produções deste período obteve R^2=0,615 para as 3 primeiras produções, R^2=0,489 para as 2 primeiras produções e R^2=0,070 para a primeira produção, esta última, sendo muito baixo. A seguir são apresentados as estimativas dos melhores índices, incluindo-se outras características correlacionadas com a produção, para as características disponíveis até o terceiro, segundo e primeiro ano de colheitas, bem como sem a produção.

Três primeiros anos: R^2=0,791 usando-se as características tamanho dos grãos, produção de grãos ÷ produção de frutos, altura da copa, diâmetro da copa, produção do 1°. biênio, incremento anual da produção nos 3 primeiros anos de produção e oscilação anual da produção nos 3 primeiros anos.

Dois primeiros anos: R^2 = 0,717 usando-se as características tamanho dos grãos, produção de grãos ÷ produção de frutos, altura da copa, diâmetro da copa e produção do primeiro biênio.

Primeiro ano: R^2 = 0,571 usando-se as características tamanho dos grãos, produção de grãos ÷ produção de frutos, altura da copa, diâmetro da copa e 1ª. produção.

Sem produção: R^2 = 0,454 usando-se apenas altura e diâmetro da copa.

O R^2 obtido usando-se produção e caracteres correlacionados é sempre maior que apenas usando a produção. Usando-se apenas altura e diâmetro da copa obteve-se R^2 quase igual ao R^2 usando as duas primeiras produções, o que está concordando com os resultados práticos alcançados por ARAÚJO (1977) e pelos trabalhos de SRINIVASAN(1982) e WALYARO (1983). SERA (1987) comparando-se as classificações obtidas pelas progênies, com base na produções totais observadas e as estimadas antecipadamente por índices verificou-se que para se incluir as sete melhores progênies das 72 (i = 10%) seriam necessários selecionar as 13 melhores nos três primeiros anos, as 20 melhores nos dois primeiros anos e as 50 melhores no primeiro ano de colheita. Portanto, seria viável antecipar a seleção com segurança razoável tendo-se dados de produção e caracteres correlacionados obtidos nos dois primeiros anos de colheitas.

Assim, é viável a seleção antecipada na redução do tempo gasto no desenvolvimento de cultivares **(QUADRO 1)** usando-se índices de produção composto por produções iniciais e características correlacionadas e, para garantir que as progênies selecionadas antecipadamente incluam as progênies realmente superiores em produção total, é aconselhável utilizar intensidades de seleção mais brandas, tanto entre como dentro das progênies.

QUADRO 1. Comparação de tempo gasto na obtenção de cultivares do tipo linhagem usando-se métodos genealógico, seleção em gerações precoces, seleção em gerações precoces com tempo reduzido, SSD com tempo reduzido e retrocruzamento numa planta autógama perene propagada por semente (cafeeiro *Coffea arabica* L.).

	MÉTODOS DE MELHORAMENTO				
Ano	**Genealógico**	**Seleção em gerações precoces**	**Seleção em gera-ções precoces com tempo reduzido**	**S.S.D. com tempo reduzido**	**Retrocruzamento (caráter domi-nante)**
1	Planta F_1	Planta F_1	Planta F_1	Planta F_1	Planta F_1. RC_1
2	Colheita e plantio	Colheita e plantio	Colheita e plantio	Colheita e plantio	Florada e RC_2
3	Florescimento	F_2 e Florescimento	F_2 e Florescimento	F_2 e Florescimento	Planta F1. RC_2
4	1ª colheita	1ª. colheita	1ª. colheita	Colheita e plantio	Florada e RC_3
5	2ª.colheita e plantio	2ª. colheita e plantio	2ª colheita e plantio	F_3 e Florescimento	Planta e F_1. RC_3
6	F_2 e Florescimento	F_3 e Florescimento	F_3 e Florescimento	Colheita e plantio	Florada e ⊗
7	1ª colheita	1ª. colheita	1ª. colheita	F_4 e Florescimento	F_2 e homozigotos
8	2ª.colheita e plantio	2ª. colheita e plantio	2ª. colheita e plantio	1º. Teste regional	**CULTIVAR**
9	F_4 e Florescimento	F_4 e Florescimento	F_4 e Florescimento	2º. Teste regional	Semente básica
10	1ª. Colheita	1º. teste regional	1º. teste regional	**CULTIVAR**	Florada
11	2ª.colheita e plantio	2º. teste regional	2º. teste regional	Semente básica	1ª. Produção
12	F_5 e Floresciimento	3º. teste regional	**CULTIVAR**	Florada	LANÇAMENTO
13	1ª. Colheita	4º. teste regional	Semente Básica	1ª. Produção	Semente comercial
14	2ª.colheita e plantio	5º. teste regional	Florada	LANÇAMENTO	Florada
15	F_6 e Florescimento	6º. teste regional	1ª. produção	Semente comercial	*CAFEZAL*
16	1º. teste regional	**CULTIVAR**	LANÇAMENTO	Florada	
17	2º. teste regional	Semente Básica	Semente comercial	*CAFEZAL*	
18	3º. teste regional	Florada	Florada		
19	4º. teste regional	1ª. produção	*CAFEZAL*		
20	5º. teste regional	LANÇAMENTO			
21	6º. teste regional	Semente comercial			
22	**CULTIVAR**	Florada			
23	Semente Básica	*CAFEZAL*			
24	Florada				
25	1ª. Produção				
26	LANÇAMENTO				
27	Semente comercial				
28	Florada				
29	1ª colheita				
30	*CAFEZAL*				

5. 5. Seleção em gerações precoces

É usado em espécies autógamas e alógamas selecionando indivíduos, linhas ou populações no estádio inicial de endogamia.

O objetivo é eliminar linhas ou populações que não apresentem mérito para posterior seleção. Em 1941, Immer indicou que testes repetidos de populações segregantes F_2 ou F_3 forneceria o desempenho produtivo médio dos diferentes cruzamentos. Nilson-Ehle indicou o uso deste método para identificar plantas F_2 superiores através de teste de progênies com repetições e então, avaliar e selecionar indivíduos homozigotos dentro de linhas derivadas de F_2.

Este procedimento pode identificar progênies Homozigotas em gerações precoces como F_3 reduzindo o tempo gasto no desenvolvimento de cultivares **(QUADRO 1)**, embora o custo da condução dos ensaios de materiais ainda segregantes aumente muito. Em plantas perenes em que o tempo é fator limitante, é compensador, pois, indivíduos, linhas ou populações inferiores são descartadas cedo no processo de endogamia.

características de alta herdabilidade como precocidade de maturação dos frutos podem ser selecionadas em gerações F_2. Características altamente correlacionadas com a produção como vigor vegetativo, ramificação, volume da copa, tamanho dos grãos podem ser selecionadas com sucesso.

Características de baixa herdabilidade como a produção, podem ser selecionadas também na

F_2, desde que a varibilidade genética do germoplasma seja alta e o tamanho populacional e o controle ambiental seja rigoroso.

5. 6. Métodos que não avaliam a produção em gerações iniciais

Métodos de melhoramento como descendência de semente única ou "Single-Seed-Descent" (SSD), população e retrocruzamento, podem levar a rápido avanço nas gerações segregantes em direção a homozigose ou a ter alta semelhança ao parental recorrente. Permitem o avanço de trabalhos de melhoramento em certa etapa sem realizar a avaliação da produtividade, que são operações caras e demoradas. O método SSD será usada como exemplo para ilustrar a vantagem de se usar a alternativa de avançar as gerações precoces sem selecionar para a produção.

O método genealógico era popular para população endógama de plantas anuais quando somente uma geração era conduzida por ano. Atualmente, tem sido desbancado por outros métodos como o SSD conduzindo duas a três gerações num ano usando casa de vegetação, estufa ou viveiro. Uma comparação dos métodos genealógico, genealógico com seleção em gerações precoces com e sem seleção antecipada para produtividade, SSD e retrocruzamento aplicado ao cafeeiro é apresentada no **Quadro1.**

5. 7. Uso de técnicas biotecnológicas

Abrem novas perspectivas para o melhoramento genético de espécies perenes como o cafeeiro, as quais tem o problema do fator longo tempo gasto para o desenvolvimento de cultivares (ROCA & MROGINSKI, 1991; SÖNDHAL et al., 1981; SÖNDHAL & LOH, 1988).

5.7.1. Cultura de embriões e meristemas. As técnicas como, cultura de embriões e cultura de meristema já tem aplicação prática na pesquisa visando aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

5.7.2. Cultura de micrósporos e de óvulos. A cultura de micrósporos ou de óvulos, levando a produção de uma grande quantidade de plantas haplóides a serem duplicados e obtidas as linhagens duplo-haplóides completamente homozigotas já na geração F_2 apresentam um grande potencial.

5.7.3. Embriogênese somática a partir de folhas. A embriogênese somática direta ou indireta, começa a ser aplicado na redução do tempo gasto no desenvolvimento de cultivares, especialmente no uso de cultivares do tipo clone de indivíduos híbridos simples ou híbridos duplos, agregando várias características agronômicas num genótipo com heterose.

5.7.4. Transformação genética ou transgênese. A transformação genética de cultivares por incorporação de DNA de outras espécies, gêneros ou mesmo de espécies muito distantes, introduzidos por vetores como A*grobacterium* e outros e por biobalística por bombardeamento de DNA de genes que deseja incorporar no cafeeiro está tornando realidade a transferência de genes não presentes no gênero *Coffea,* como por exemplo genes de resistência a broca dos frutos *Hypotenemus hampei* e genes de resistência a um herbicida de ação total, muito importante em cultivo intensivo como em plantio em espaçamentos adensados, super-adensados e hiper-adensados. Características de amplo uso nas cultivares como os genes da arquitetura da planta (Ex.: compata, erecta e cônica), macho esterilidade, maturação precoce e tardia, resistência a nematóide etc poderão ser incorporados rapidamente num futuro próximo em cultivares comerciais de alta produtividade e qualidade.

5.7.5. Seleção assistida por marcadores de DNA.

O uso de marcadores moleculares para seleção asssistida sem dúvida poderá reduzir muito o tempo gasto no desenvolvimento de cultivares de café de várias formas. A seleção na fase juvenil realizada em laboratório para características qualitativas como a arquitetura da planta, cor do fruto, % de frutos com lojas vazias, resistência a parasitos dos frutos e outros determinados na fase juvenil trarão grandes benefícios na eficiência de um programa de melhoramento.

Outras técnicas como a hibridação assexuada via fusão de protoplastos, seleção "*in vitro*", "DNA fingerprinting" e a criopreservação, entre outros, auxiliarão muito no aumento da eficiência seletiva, com tendência para se incorporar definitivamente como ferramenta rotineira de melhoristas do futuro próximo. O melhoramento genético que começou de forma empírica evoluiu para o melhoramento científico, está caminhando em direção ao melhoramento genético biotecnológico ou a engenharia genética.

5. 6. Uso de cultivares duplo-haplóides

Para as espécies autógamas como o café arábico, onde o produto comercial é um grão, o mais econômico para os agricultores é o uso de cultivares do tipo linhagem propagadas por sementes. O tempo dispendido para o desenvolvimento de linhagens pelo método usual é longo, geralmente em torno de 25 anos (MEDINA *et al.*, 1984) e este prazo pode ser reduzido para algo como seis anos.

Outro tipo de cultivar em que se usa as linhagens, são as cultivares do tipo multilinha. Usado para dar maior estabilidade fenotípica a cultivar, pela mistura mecânica de diversas linhagens em proporção conhecida. É usado também para reduzir o tempo gasto no desenvolvimento de cultivares com resistência a diversas raças fisiológicas de patógenos bem como para dar maior durabilidade a resistência frente às mutações dos patógenos.

Necessita-se normalmente de muito tempo para se chegar a uma linhagem homozigota. Para reduzir este tempo, existe a alternativa de se chegar a linhagens a partir de plantas haplóides duplicadas (NITZSCHE & WENZEL,1977).

Nos procedimentos usuais de melhoramento, a obtenção de cultivares do tipo linhagem é conseguida através de sucessivas gerações de auto-fecundações. Duplo-haplóides são plantas homozigotas obtidas pela duplicação dos cromossomas de células ou tecidos haplóides. A produção de linhas diplóides homozigotas por duplicação do complemento cromossômico de indivíduos haplóides é um método alternativo de desenvolvimento de cultivares num prazo muito curto. Existem diversos métodos de obtenção de duplo-haplóides, convencionais ou biotecnológicos, e que podem ser utilizados em plantas perenes.

Existe a possibilidade de utilizar plantas haplóides obtidas por métodos convencionais, naturais ou induzidas (método bulbosum) no processo de obtenção de linhagens homozigotas em cafeeiro.

5. 7. Uso da heterose de cultivares híbridas

Cultivares híbridas são utilizadas em diversas culturas e visam aproveitar a heterose normalmente observada nas híbridações (ver capítulo sobre o assunto em outra parte deste livro). Em plantas perenes, o custo da semente híbrida pode ser amortizado por vários anos de produção. Se um híbrido, por exemplo, produzir 20 % a mais por ano do que uma cultivar do tipo linhagem, em cinco anos ter-se-á um adicional de produção equivalente à uma safra extra. Em plantas perenes pode ser inclusive dispensada a emasculação genética e a busca de auto-incompatibilidade. A emasculação e a polinização manual podem ser viáveis em diversos cultivos, especialmente em plantas que produzem muitas sementes por fruto como o maracujazeiro, cacaueiro e anonáceas. Em cafeeiro em que cada flor dá apenas duas sementes em média, pode se lançar mão de gameticidas e emasculação térmica. A utilização de híbridos pode, também, representar uma grande economia de tempo, permitindo que o melhorista possa testar diversas combinações de linhagens, selecionar as mais promissoras e lançá-las como cultivares. Pode-se, inclusive trabalhar com diferentes tipos de híbridos.

a)Cultivares do tipo híbrido F1. São cultivares normalmente obtidas pela híbridação de linhagens homozigóticas ou heterozigóticas, sendo mais viável para plantas perenes que produzem muitas sementes por fruto. A disponibilidade de genes de macho-esterilidade e auto-incompatibilidade, bem como de técnicas químicas, térmicas e hídricas de indução do macho-esterilidade podem facilitar ainda mais o uso desta alternativa, especialmente em plantas que produzem poucas sementes por fruto.

b)Cultivares do tipo híbrido F2. Caso a venda de sementes híbridas F_1 seja antieconômica, pode-se, em alguns casos, cultivar comercialmente as plantas híbridas F_2, especialmente para plantas perenes que produz poucas sementes por fruto e que o produto é comercializado a granel (Ex. café). Neste caso pode-se aproveitar cerca de metade da heterose do F_1. Algumas características como a época de colheita e o tamanho da planta devem ser uniformes, porém em alguns cultivos pode-se admitir variabilidade para esta e outras características agronômicas.

c) Cultivar do tipo sintético. Procura preservar o vigor de híbrido sem ter que obter as sementes híbridas toda vez que for plantar. Uma população base de combinações híbridas com heterose de plantas alógamas são usadas para formar o lote de matrizes para que as sementes tiradas a partir daí permitam alcançar produtividades maiores que as cultivares do tipo linhagem ou população. Pode ser usado em café robusta (*Coffea canephora*).

5. 8. Uso de cultivares do tipo clone

São cultivares propagadas vegetativamente, ou seja, todos os descendentes são geneticamente iguais à planta que deu origem às mudas ("planta-mãe"). A propagação vegetativa por meios convencionais como a estaquia e a enxertia ou não convencionais como a micropropagação 'in vitro' permitem obter rapidamente cultivares superiores. A propagação vegetativa permite a utilização de toda a variância genética disponível e a seleção normalmente recai sobre plantas altamente heterozigóticas.

As plantas de grande valor econômico como frutíferas e ornamentais são no geral propagadas vegetativamente e constituem variedades do tipo clone com alta heterosigosidade.

Nas plantas em que ainda não compensa economicamente a propagação vegetativa, as pesquisas podem ser direcionadas visando aperfeiçoar as técnicas para reduzir os custos deste tipo de propagação.

A micropropagação tem sido utilizada em diversos cultivos (cana-de-açúcar, bananeira, abacaxizeiro, morangueiro, eucalipto, etc) e apresenta como vantagens, além da rápida propagação, a possibilidade da obtenção de materiais livres de patógenos, especialmente vírus. Por outro lado, durante o processo de micropropagação "in vitro" existe a possibilidade de serem encontradas variações genéticas herdáveis, economicamente importantes nas progênies (variação somaclonal).

A utilização de cultivares do tipo clone já é realidade no Brasil através do uso de estaquia convencional de café conillon de *Coffea canephora*. Embora seja de custo quadruplicado, a maior produtividade e uniformidade aliado a outras características de cultivares clonados, tem mantido o interesse de muitos cafeicultores a implantarem lavouras comerciais.

O uso de cultivares clonados a partir de folhas de genótipos superiores híbridos por embriogênese somática usando bioreatores está indicando suficiente estabilidade genética e viabilidade econômica. Com isso, vislumbra a possibilidade de aplicação imediata da biotecnologia no melhoramento genético e na cafeicultura.

5. 9. Lançamento antecipado de cultivares

Em culturas perenes, em que se necessita de vários anos para avançar uma geração de seleção, é interessante adotar um esquema apropriado de antecipação do lançamento de cultivares para aumentar a eficiência do programa de melhoramento. Para isso, é necessário gastar mais em termos de área experimental, avaliação e multiplicação de um número maior de seleções, bem como a instalação de uma área maior e de um número maior de cultivares potenciais num campo de semente básica para ganhar tempo. Em café arabica é possível ganhar 10 anos pela condução simultânea de avaliação regional, formação de campo de semente básica e campo de semente fiscalizada, desde que protegida a origem por marcadores genéticos moleculares ("DNA fingerprinting") de cultivares potenciais.

a) Avaliação regional antecipada de seleções. Todos os materiais promissores devem ser testados regionalmente, simultâneo a seleção final, a fim de ganhar uma etapa do processo total desde o cruzamento até o plantio comercial. Consiste em avaliar um número bem maior de progênies promissoras para incluir dentre elas as cinco primeiras seleções que poderão se tornar cultivares, ganhando-se algo como quatro anos (SERA, 1987). Por exemplo, se pretende englobar no ensaio regional as 5 primeiras e o grau de precisão na discriminação antecipada de seleções superiores for de apenas 15% e necessita de mais 4 anos para ter maior segurança na avaliação do potencial produtivo futuro com $h^2 = 0,35$, então, para ganhar estes quatro anos, devemos testar pelo menos 35 seleções promissoras ao invés de 15 seleções.

b) Instalação antecipada de campo de semente básica. Para ganhar pelo menos mais 4 anos, devemos iniciar concomitante a instalação do ensaio regional, campo de semente básica englobando estes genótipos promissores. As parcelas das seleções não confirmadas para a recomendação deverão ser eliminadas e completadas com materiais recomendados e, após mais dois anos, passará a fornecer semente para lavouras comerciais junto com o fornecimento de sementes fiscalizadas.

c) Lançamento antecipado de cultivares. O lançamento antecipado de cultivares em gerações precoces, com certa variabilidade para características sem muita importância agronômica e para produtividade, tamanho dos fruto ou grão, permite lançar versões inacabadas com características de alto valor agronômico com 4 anos de antecedência como por exemplo para pragas e doenças chaves, qualidade, etc, tem alto retorno econômico-social para os agricultores. O prosseguimento da seleção

permite o lançamento posterior de versões melhoradas.

6. CONCLUSÕES

Através da combinação de um conjunto de métodos, técnicas e procedimentos de melhoramento genético é possível ganhos consideráveis na eficiência de um programa de melhoramento de cafeeiro, planta perene onde o fator tempo é a principal limitante para se ter um ganho genético razoável por ano até a obtenção e o plantio de cultivares melhoradas. As soluções adotadas para outras culturas diversas da que se está trabalhando podem servir para dar uma grande contribuição tanto em termos de economia de recursos como de tempo, tornando o trabalho menos cansativo e mais realizador.

Um planejamento estratégico do programa de melhoramento de cafeeiro é vital e decisivo na vida do melhorista. É necessário além de um profundo conhecimento de todos os aspectos da cultura que trabalha, desde a origem e evolução da espécie até a competitividade comercial, para evitar que o trabalho de uma vida toda resulte em poucos resultados.

O êrro de estratégia de um melhorista de café é muito frustrante, pois não tem muito mais tempo para reiniciar ou melhorar o programa, porque frequentemente gasta-se mais de 20 anos a partir do cruzamento para se chegar a uma cultivar de sucesso. O diagnóstico da cultura com seus problemas e potencialidades e o conhecimento prático da cultura para intervenção, mais certeira possível, atacando prioridades maiores dentro das altas prioridades é fundamental. O fator tempo para o desenvolvimento de cultivares pode ser minimizado muito, reduzindo de 20 para até 10 anos mudando-se alguns procedimentos simples na estratégia de desenvolvimento de cultivares e de métodos de melhoramento e agregando novas ferramentas como as técnicas biotecnológicas, informática e bioestatística. O ganho genético por ano pode dar um salto em função da maior disponibilidade de recursos humanos, materiais, tempo e espaço.

7. REFERÊNCIAS PARA CONSULTA:

ANTUNES FILHO & CARVALHO, A. Melhoramento do cafeeiro: XII. Variabilidade em linhas puras de café. *Bragantia*, Campinas, 16: 197-213, 1957.

ARAÚJO NETO, K. de. Avaliação preliminar de progênies de *Coffea arabica* pela estimativa simultânea de vigor vegetativo e carga pendente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 6. Ribeirão Preto, 1978. Resumos. Rio de Janeiro, Ministério da Indústria e Comércio -IBC, 1978. p.110-113.

CANNELL, M. G. R. Crop physiological aspects of coffee bean yield. *Journal of coffee Reserch*, Karnataka, 5(1/2):7-20, 1975.

CANNELL, M. G. R. Physiology of the coffee crop. In: CLIFFORD, M. D. & WILLSON, K. C., (ed). *Coffee, botany, biocemistry and production of beans and beverage*. Westport, AVI, 1985. p.251-83.

CARVALHO, A. Melhoramento do cafeeiro: VI. Estudo e interpretação para fins de seleção de produções individuais na variedade Bourbon. *Bragantia*, Campinas, 12(6):179-200, abr.-jun., 1952.

CARVALHO, A. Evolução nos cultivos de café. *O agronômico*, Campinas, 37(1):7-11, 1985.

CARVALHO, A & MÔNACO, L. C. Melhoramento do cafeeiro: XXXI. Ensaio de populacões F_2 de híbridos entre cultivares de *Coffea arabica*. *Bragantia*, Campinas 26(5):79-92, 1967.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C.; ANTUNES-FILHO, H. Melhoramento do cafeeiro: XV. Variabilidade observada em progênies de café. *Bragantia*, Campinas, 18 (26):374-86, 1959.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C.; CAMPANA, M. P. Melhoramento do cafeeiro: XXVII. Ensaio de seleções regionais de Jaú. *Bragantia*, Campinas, 23 (13):129-42, 1964.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C.; FAZUOLI, L. C. Melhoramento do cafeeiro: XL. Estudos de progênies e híbridos de café 'Catuaí'. *Bragantia*, Campinas, 38 (22):202-16, 1979.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. da; MEDINA, H. P. Variabilidade na produção em progênies de cafeeiro 'Mundo Novo'. *Bragantia*, Campinas, 4 (32):509-17, 1984.

CARVALHO, A.; SCARANARI, H. J.; ANRUNES-FILHO, H.; MÔNACO, L. C.. Melhoramento do cafeeiro: XXII. Resultados obtidos no ensaio de seleções regionais de Campinas. *Bragantia*, Campinas, 20 (30):711-40, 1961.

CASTILLO-ZAPATA, J. & MORENO-RUIZ, G. Selecion de cruzamentos derivados del "Híbrido de Timor" en la obtención de variedades mejoradas de café para Colômbia. *Cenicafé*, Chinchiná, abr./jan. 37-53 1981.

CASTILLO-ZAPATA, J. & QUICENO, G.

Estudio de la producción de seis variedades comerciales de café. *Cenicafé*, Chinchiná, 19 (1):18-39, 1968.

CHARRIER, A. & BERTHAUD, J. Principles and methods in coffee plant breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: CLARKE, R. J. & MACRAE, R. (ed). *Coffee Volume 4: Agronomy*. London, Elsevier, 1988. p. 167-198.

DHALIWAL, T. S. Correlation between yield and morphological characters in Puerto Rican and Columnaris varieties of *Coffea arabica* L.. *Journal of the Agricultural University of Puerto Rico*, 52:29-37, 1968.

EBERHART, S. A. & RUSSEL, W. A. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science*, Madison, 6: 36-40, jan./fev. 1966.

FAZUOLI, L. C. Avaliação de progênies de café 'Mundo Novo'(*Coffea arabica* L.). Piracicaba, 1977. 146 pp (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP).

FONSECA, M. A. S. de; ARAÚJO, P. F. C. de; PEDROSO, I. A. *Retorno social aos investimentos em pesquisa na cultura do café*. São Paulo, BADESP, 1978. 14 p.

GIFFORD, M. R. & EVANS, L. T. Photosynthesis, carbon paritioning, and yield. *Ann.Rev.Plant. Physiol*, 32:485-509, 1981.

MATIELLO, J. B.; SOUZA, D. D. de; ASSUMPÇÃO, J. M.; ÁVILES, D. P. Análise do ciclo bienal da produção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRAS, 12., Caxambu, 1985. *Resumos*. Rio de Janeiro, Ministério da Indústria e Comércio - IBC, 1985. p. 217-219.

MAWARDI, S. & HARTOBUTOYO, S. Correlation study of yield and branch characteristics of robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta* Cheval.) on F_1 hybrid population. *Menara Perkebunan*, Jember, 49 (5) : 115-20, 1981.

MAWARDI, S.; ISWANTO, A.; HARTOBUTOYO, S. Selection of the F_2 population of arabica coffee: II. A preliminary study for individual selection by applying selection indexes. *Menara Perkebunan*, Jember, 51 (5), 128-32, 1983.

MEDINA, H. P.; CARVALHO, A.; SÖNDAHL, M. R.; FAZUOLI, L. C.; COSTA, W. M. da. Coffee breeding and related evolutionary aspects. In: JANICK, J., ed. *Plant breeding reviews*. Westport, AVI, 1984. p. 157-94.

MENDES, L. O. T. Poliploidização da seringueira: um novo teste para determinação da capacidade de produção de seringueiras jovens. *Polimeros* 1(1): 22-30, 1971.

MÔNACO, L. C. Efeito das lojas vazias sobre o rendimento de café 'Mundo Novo', *Bragantia*, Campinas, 12: 179-200, 1952.

MÔNACO, L. C.; MEDINA F°, H. P.; SÖNDAHL, M. R.; LIMA, M. M. A. DE.. Efeito de dias longos no crescimento e florescimento de cultivares de café. *Bragantia*, 37 (4): 25-30, 1978.

MÔNACO, L. C.; SCALI, M. H.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. Variabilidade no sistema radicular de genótipos de café. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 25., Ilha do Fundão/GUANABARA, 1973. *Resumos*. Ilha do Fundão, SBPC, 1973. p. 247.

MORENO-RUIZ, G.; CASTILLO-ZAPATTA, J.; OROZCO-GALLEGO, L. Estabilidade de la produccion de progenies de cruzamientos de 'Caturra' por 'Híbrido de Timor'. *Cenicafé*, Chinchaná, out./dez.:79-90, 1984.

NITZSCHE, W. & WENZEL, G. Haploids in plant breeding. **In**: Advances in Plant Breeding (Suplements to Journal of Plant Breeding). Berlin, Verlag, 1977. 101 p.

RAMOS, L. C. da S. Desenvolvimento da plântulas de quatro cultivares de café. *Bragantia*, Campinas, 39:215-8, 1980.

RAMOS, L. C.; LIMA, M. M. ALVES DE & CARVALHO, A. Crescimento do sistema radicular e da parte aérea em plantas jovens de cafeeiros. *Bragantia*, Campinas, 41:93-99, 1982

ROCA, W. M. & MROGINSKI, L. A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colômbia, 1991. 969 pp.

ROCHA, T. R.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. Melhoramento do cafeeiro: XXXVIII. Observações sobre progênies do cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica* na Estação Experimental de Mococa. *Bragantia*, Campinas, 39 (15):148-60, 1980.

SERA, T. Zoneamento varietal de café no Paraná. **In:** ANAIS DO... Congr. Bras. Pesq. Cafeeiras, 1979. Ribeirão Preto.

SERA, T. Estimação dos componentes da variância e do coeficiente de determinação genotípica da produção de grãos de café (*Coffea arabica* L.). Piracicaba, 1980. 62 pp. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SERA, T. Seleção precoce para produção no melhoramento genético de plantas perenes. Piracicaba, 1984. 115 pp. (Monografia da disciplina Tópicos Especiais de Genética - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).

SERA, T. Possibilidade de emprego de seleção nas colheitas iniciais de café (*Coffea arabica* L. cv. Acaiá). Piracicaba, 1987. 147 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).

SÖNDAHL., M. R.; MÔNACO, L. C.; CARVALHO A.; FAZUOLI, L. C. Efeito de dias longos em progênies de café (*Coffea arabica),* tratados com benziladenina e giberelina. *Ciência e Cultura*, 24 (sup.):336, 1972.

SÖNDAHL., M. R.; MONACO, L. C.; SHARP, W. R. *In vitro* methods applied to coffee. In: THORPE, T. (Ed.). *Plant tissue culture - methods and applications in agriculture.* New York, Academic, 1981. p. 325-348.

SÖNDAHL, M. R. & LOH, W. H. -T. Coffee biotechnology. In: CLARKE, R. J. & MACRAE, R. (ed). *Coffee Volume 4: Agronomy.* London, Elsevier, 1988. p. 236-262.

SRINIVASAN, C. S. Association of some vegetativa characters with initial fruit yield in coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Coffee Research*, Karnataka, 10 (2):21-7, 1980.

SRINIVASAN, C. S. Pre-selection for yield in coffee. *Indian Journal of Genetics*, New Delhi, 42 (1) : 15-9, 1982.

SRINIVASAN, C. S. & SUBBALAKSHMI , V. A biometrical study of yield variation in some coffee progenies. *Journal of Coffee Research*, Karnataka, 11 (2):26-34, 1981.

SRINIVASAN, C. S. & VISHVESHWARA, S. Variability and breeding value of some characters related to yield in a world collection of arabica coffee. *Indian Coffee*, Bangalore, 15 (5):119-28, 1981.

STEVENS, W. L. Análise estatística do ensaio de variedades de café. *Bragantia*, Campinas, 9 (5-8):103-123, 1949.

TORRES, R. Índice de Seleção. Piracicaba, 1985. 77 p. (Monografia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VALENCIA A., G. Relation entre el indice de area foliar y la productividad del cafeto. *Cenicafé*, Chinchiná, out./dez:79-89. 1973.

VAN DER VOSSEN, H. A. M. Coffee selection and breeding. In : CLIFFORD, M. N. & WILLSON, K. C. ed.. *Coffee; Botany, biochemistry and production of beans and beverage.* Westport, AVI, 1985. p. 48-96.

WALYARO, D. J. & VAN DER VOSSEN, H. A. M. Early determination of yield potential in arabica coffee by applying index selection. *Euphytica*, Wageningen, 28:465-472, 1979.

WELLENSIEK, S. J. Shortening the breeding cycle. *Euphytica* 11:5-10, 1962.

WALYARO, D. J. Considerations in breeding for improved yield and quality in arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Wageningen, 1983. 119 p. (Doutorado - Agriculltural University).

WALYARO, D. J. & VOSSEN, H. A. M. Van Der. Early determination of yield potencial in arabica coffee by applying index selection. *Euphytica*, Wageningen, 28:465-72, 1979.

DESENVOLVIMENTO DE CAFEEIROS RESISTENTES A INSETOS.

Oliveiro Guerreiro Filho.

Instituto Agronômico deCampinas - Centro de Café e Plantas Tropicais
CP 28 - CEP 13.001-970 - Campinas - SP - Brasil

INTRODUÇÃO

A produção de café no Brasil no ano agrícola 1998/1999 atingiu cerca de 34 milhões de sacas, sendo 29,5 milhões de sacas oriundas de cultivares de *C. arabica*. Como todos estes cultivares são suscetíveis à *Perileucoptera coffeella*, a principal praga da cultura no país, as perdas de produção na cultura são altamente significativas. O Instituto Agronômico de Campinas, vêm há alguns anos desenvolvendo cultivares de *C. arabica* que aliem níveis elevados de produtividade, resistência a este inseto praga e boa qualidade da bebida. As principais etapas desenvolvidas neste programa, são descritas a seguir.

Identificação de fontes de resistência.

Como *Coffea arabica* é a única espécie tetraplóide (2n = 44 cromossomos) do gênero *Coffea*, a busca de fontes de resistência ao inseto teve início em indivíduos da espécie, sendo que nenhum cultivar, introdução ou forma botânica de *C. arabica* revelou-se resistente ao bicho mineiro. No entanto, diferentes níveis de resistência foram encontrados em espécies diplóides (2n = 22 cromossomos) do gênero *Coffea*. O mais alto nível de resistência ao inseto é verificado em *C. stenophylla*. Nesta espécie, as lagartas morrem imediatamente após a eclosão, sendo as lesões nas folhas dificilmente visíveis a olho nu. Outras espécies como *C. liberica*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. salvatrix* e *C. racemosa* apresentam também níveis elevados de resistência, mas invariavelmente segregam, em maior ou menor escala, para esta característica. Estudos realizados por Guerreiro-Filho (1994), evidenciaram também que várias espécies Malgaches como *C. tetragona*, *C. bertrandi*, *C. milloti*, *C. resinosa*, *C. tsiramanae*, *C. bonnieri*, *C. dolichophylla* e *C. farafanganensis*, conhecidas pela ausência de cafeína em suas sementes, podem também serem consideradas como resistentes ao bicho mineiro. Apesar do maior nível de resistência apresentado por *C. stenophylla*, barreiras geneticas bastante importantes, dificultam a hibridação desta espécies com C. arabica. Resultados semelhantes são observados com a utilização das espécies Malgaches. Assim, no programa de melhoramento do cafeeiro visando resistência ao bicho mineiro
desenvolvido pelo Instituto Agronômico de Campinas, *C. racemosa* foi escolhida como parental doador de genes de resistência, pois apresenta intenso florescimento (Carvalho & Monaco, 1967) o que facilita as hibridações com *C. arabica*, é resistente à seca (Medina-Filho *et al.*, 1977) e apresenta maturação precoce dos frutos (Coste, 1955; Levy *et al.*, 1984). Além dessas características de inestimável valor agronômico, indivíduos pertencentes à segunda geração de retrocruzamentos naturais (RC_2) entre *C. arabica* e *C. racemosa* foram identificados por Medina-Filho *et al.* (1977) como sendo resistentes à *P. coffeella*. Essa descoberta incorreu em uma considerável economia de tempo e recursos no programa de seleção. A transferência da resistência para variedades comerciais suscetíveis de *C. arabica* teve início através dos cruzamentos dirigidos realizados entre estes cultivares e os indivíduos RC_2 C1195-5-6-1 e C1195-5-6-2, classificados como resistentes.

Metodologia para seleção de plantas resistentes.

A seleção de indivíduos resistentes é realizada, em uma primeira etapa, no viveiro, descartando-se as plantas suscetíveis de cada progênie obtida por cruzamentos dirigidos ou autofecundações. Posteriormente, as plantas resistentes ou àquelas suscetíveis ocasionalmente não atacadas, são avaliadas individualmente em laboratório utilizando-se a metodologia descrita por Guerreiro-Filho (1994) que consiste na utilização de um suporte onde o pecíolo de folhas destacadas é mantido hidratado durante o período de exposição aos insetos. Cerca de 40 plantas podem ser infestadas diariamente através desta metodologia. Discos de folhas são retirados a partir dos locais onde foram feitas as posturas, sendo mantidos sob espuma em câmaras úmidas por aproximadamente 15 dias até o

desenvolvimento completo das lesões no tratamento controle. A avaliação da resistência é feita pelo tipo de reação sendo as plantas classificadas em 4 grupos: 1 = lesões pontuais (Resistentes); 2 = lesões filiformes (Moderadamente Resistentes); 3 = lesões grandes e irregulares (Moderadamente Suscetíveis) e 4 = lesões grandes e arredondadas, característica das lesões verificadas em *C. arabica* (Suscetíveis). Apenas as plantas classificadas como resistentes, são utilizadas para instalação de ensaios. No campo, a avaliação da resistência ao bicho mineiro é realizada através de uma escala quantitativa (1 a 10 pontos), atribuindo-se os pontos em função do nível de infestação das plantas. Notas mais altas são atribuídas aos indivíduos suscetíveis, tendo os cultivares comerciais como referência e notas mais baixas às plantas com menor nível de ataque.

Criação artificial em insetário.

A produção massal de insetos utilizados nos testes de resistência em laboratório é realizada segundo a metodologia descrita por Kativar & Ferrer (1968), em gaiolas de madeira cobertas com tecido, mantidas em insetário com temperatura de 27 ± 2ºC, fotoperíodo de 14h e umidade relativa de 70 ± 10%. Mudas jovens de cafeeiros suscetíveis, são introduzidas nas gaiolas e substituídas na manhã seguinte. O número de plantas, assim como a permanência das mesmas nas gaiolas, varia com o tamanho da população de insetos. Uma vez infestadas, as mudas são mantidas em prateleiras nas mesmas condições do insetário até que os insetos atinjam a fase de crisálida. Nesta ocasião, as folhas contendo crisálidas são destacadas das plantas e recolocadas no interior das gaiolas de criação, onde ocorre a emergência dos adultos e o consequente fechamento do ciclo biológico dos insetos. Nas gaiolas, os adultos são alimentados com solução de Sacarose a 10%, condição que segundo Parra (1985), eleva sobremaneira o número de ovos por fêmea.

Expressão da resistência e número de genes envolvidos.

Estudos realizados por Medina-Filho *et al.* (1977), revelaram que o tamanho ou a espessura das folhas ou o nível de ploidia das plantas, não têm qualquer relação com a resistência das plantas. No entanto, Guerreiro-Filho *et al.* (1999), evidenciou que em *C. racemosa*, assim como nos híbridos entre *C. arabica* e *C. racemosa* as folhas mais velhas parecem ser mais sensíveis que as folhas mais jovens dos dois primeiros pares. Análises realizadas em progênies obtidas por autofecundação e por retrocruzamentos evidenciaram que a resistência à *P. coffeella* é governada pela expressão de dois genes complementares e dominantes, denominados *Lm1* e *Lm2*. Recentemente, alguns indivíduos triplóides foram obtidos pela hibridação entre as espécies *C. arabica* e *C. stenophylla*. A resistência desta espécie ao bicho mineiro, diferentemente de *C. racemosa*, parece ser de natureza recessiva.

Método de melhoramento.

O método de melhoramento empregado no desenvolvimento de cultivares com resistência ao inseto é o de retrocruzamentos sucessivos associado ao método genealógico, sendo que nas diversas gerações (Figura 1), são realizadas seleções para resistência, produção, características agronômicas de interesse e qualidade da bebida.

Figura 1. Origem de parte da população estudada obtida por retrocruzamentos ou polinização aberta.

Geração	População				
Parental	*C. arabica* cv. Blue Mountain (S) × *C. racemosa* CI195 (R)				
F_1	CI195 x (R) (*C. arabica* x *C. racemosa*)				
BC_1	CI195-5-6 (R) (*C. arabica* x CI195-5)				
BC_2	CI195-5-6-1(R) (*C. arabica* x CI195-5-6)	CI195-5-6-2(R) (*C. arabica* x CI195-5-6)			
BC_3	HI3684-7 (S) (IAC-81 x CI195-5-6-2)	HI1877-4 (R) (IAC-24 x CI195-5-6-2)	HI1877-11 (R) (IAC-24 x CI195-5-6-2)		
BC_3F_2	HI3684-7- HI3684-7 [OP]	HI1877-4- HI1877-4 [OP]	HI1877-11- HI1877-11 [OP]	HI1877-11-9 (R) HI1877-11 [OP]	HI1877-11-18 (R) HI1877-11 [OP]
	HI1421-17-23 (R) HI1421-17 [OP]	HI1536-3-49 (R) HI1536-3 [OP]			
BC_3F_3	HI1877-11-9- HI1877-11-9 [OP]	HI1877-11-18- HI1877-11-18 [OP]	HI1421-17-23- HI1421-17-23 [OP]	HI1536-3-49- HI1536-3-49 [OP]	
	HI3685-1* (R) (IAC-81 x HI1421-11)	HI3685-2 (S) (IAC-81 x HI1421-11)	HI3465-5 (S) (IAC-62 x HI1877-)	HI3465-7 (R) (IAC-62 x HI1877-)	HI4066-4 (R) (IAC-62 x HI2114-1)
BC_4	HI4066-11 (S) (IAC-62 x HI2114-1)	HI4060-7 (R) (IAC-62 x HI2092-)	HI4060-10 (S) (IAC-62 x HI2092-)	HI4136-5 (R) (IAC-100 x HI1421-17)	HI4104-4 (R) (IAC-72 x HI2074-)
	HI4066-12 (R) (IAC-62 x HI2114-1)	HI4066-13 (R) (IAC-62 x HI2114-1)	HI4940- (IAC-62 x HI2037-1)	HI4941- (IAC-62 x HI1877-11)	HI4945- (IAC-62 x HI2037-1)
	HI4949- (IAC-62 x HI2092-5)	HI4950- (IAC-62 x HI1877-11)	HI4961- (IAC-62 x HI1421-17)	HI4963- (IAC-62 x HI1421-11)	
	HI3685-1-** (IAC-81 x HI1421-11) [OP]	HI3685-2- (IAC-81 x HI1421-11) [OP]	HI3465-5- (IAC-62 x HI1877-) [OP]	HI3465-7- (IAC-62 x HI1877-)[OP]	HI4066-4- (IAC-62xHI2114-1)[OP]
BC_4F_2	HI4066-11- (IAC-62 x HI2114-1) [OP]	HI4060-7- (IAC-62 x HI2092-) [OP]	HI4060-10- (IAC-62 x HI2092-) [OP]	HI4136-5- (IAC-100 x HI1421-17) [OP]	HI4104-4 (IAC-72 x HI2074)[OP]
	HI4066-12- (IAC-62 x HI2114-1) [OP]	HI4066-13- (IAC-62 x HI2114-1) [OP]			
BC_5	HI4955- (IAC-62 x HI3376-8)	HI4926- (Pacas x HI3685-1)	HI4998- (IAC-62 x HI4096-2)	HI4954- (IAC-62 x HI3685-1)	HI4964- (IAC-62 x HI3660-6)
	HI4942- (IAC-62 x HI3465-7)				

* planta individual ; ** progênie ; (R) planta resistente; (S) planta suscetível e [OP] polinização aberta; IAC-24, IAC-62, IAC-72, IAC-81 e IAC-100 são linhagens diferentes de *C. arabica* cv. Catuaí; Pacas é um cultivar de *C. arabica*

Maturação dos frutos.

A precocidade de maturação dos frutos é uma característica de bastante interesse para regiões de clima frio, onde o período de maturação dos frutos é sensivelmente retardado (Guerreiro Filho, 1992). Segundo Medina Filho *et al.* (1977b), a maturação precoce dos frutos, observada em descendências de híbridos interespecíficos (*C. arabica* x *C. racemosa*), parece ser condicionada pela ação de fatores genéticos recessivos. Cafeeiros derivados da hibridação natural entre *C. arabica* e *C. racemosa*, apresentam em condições experimentais uma grande variação, no que concerne o período de maturação dos frutos (D'antonio & Guerra Netto, 1987; Guerreiro Filho *et al.*, 1990). Os resultados obtidos no programa de melhoramento desenvolvido pelo IAC têm revelado algumas linhagens com períodos de maturação mais curtos do que os verificados nos cultivares comerciais da espécie *C. arabica*.

Qualidade da bebida.

O café produzido pela espécie *C. racemosa*, conhecido como café de Inhambane, região de Moçambique, é consumido apenas localmente, não tendo qualquer significação no volume de exportações do país. Segundo Silva (1956), a bebida é bastante aromática de coloração clara,

apresenta baixo teor de cafeína. Híbridos entre *C. arabica* e *C. racemosa* apresentaram em estudos realizados em Campinas bebida de boa qualidade, que foi sucessivamente melhorada por retrocruzamentos com *C. arabica*. Carvalho *et al.*, (1990) verificaram que a qualidade da bebida do F_1 triplóide entre *C. arabica* e *C. racemosa* e de cafeeiros pertencentes a segunda geração de retrocruzamentos para *C. arabica*, eram próximas à qualidade apresentada por *C. arabica*, utilizado como controle dos experimentos. Resultados semelhantes vêm sendo observados nas populações mais avançadas do programa de melhoramento desenvolvido em Campinas.

Estado atual do programa.

Populações avançadas, pertencentes à quinta geração de retrocruzamentos, vêm sendo cultivadas em ensaios de campo em Estações Experimentais do IAC. Várias progênies, resistentes ao bicho mineiro, e em alguns casos também à *Hemileia vastatrix*, têm apresentados produções superiores aos cultivares de *C. arabica* atualmente cultivados figura 2). Como a resistência proveniente de *C. racemosa* seria devida a presença de dois genes complementares e dominantes, realizou-se uma geração adicional de retrocruzamentos com o progenitor recorrente, o cultivar Catuaí Vermelho de *C. arabica* (A), em razão da ausência de seleção por ocasião dos dois primeiros retrocruzamentos (espontâneos) e pelo fato que esses retrocruzamentos não controlados foram realizados com variedades muito pouco produtivas. Estima-se que ainda são necessárias uma geração de autofecundação de plantas resistentes supostamente heterozigotas para os dois genes (*Lm1lm1* e *Lm2lm2*) e uma segunda geração de autofecundação das plantas resistentes provenientes da geração anterior. Os indivíduos *Lm1Lm1 Lm2Lm2* constituirão a nova variedade, enquanto as plantas *Lm1Lm1 Lm2lm2* e *Lm1lm1 Lm2Lm2* ainda en segregação numa proporção de 3 resistentes : 1 suscetível e as plantas *Lm1lm1 Lm2lm2* (9 resistentes : 7 suscetíveis), serão eliminadas.

Figura 2. Produção acumulada em 5 anos de frutos maduros expressa em kg, resistência a *H. vastatrix* (escala de 1 a 4 pontos), resistência a *P. coffeella* (escala de 1 a 10pontos) e estágio de maturação dos frutos (escala de 1 a 5 pontos) de algumas plantas em ensaios de progênies, localizados em Campinas.

Ensaio	Progênie	Produção de frutos (Kg)	Resistência *H. vastatrix*	Resistência *P. coffeella*	Maturação dos frutos
473	90/23	50	3	4	4
	MN 388-17	34	3	9	4
369		31	4	3	2
	H13685 CV 81	13	4	8	5
360		25	4	4	2
	H13465 MN 388-6	12	4	7	4
388		24	1	2	3
	H14104 MN 388-17	21	4	6	3

BIBLIOGRAFIA

Carvalho, A. & Monaco, L.C. Relações genéticas de espécies selecionadas de Coffea. Ciência e Cultura (São Paulo), vol. 19, n 1, 1967, p.151-165.

Carvalho, A., Teixeira, A.A., Fazuoli, L.C. & Guerreiro Filho, O. Qualidade da bebida de algumas espécies e populações derivadas de híbridos interespecíficos de *Coffea*. Bragantia, Campinas, 49(2):281-290, 1990.

Coste, R. Cafetos y Cafés en el Mundo. Tomo I. Les Cafés. Ed. par G.-P. Maisonneuse & Larose (Paris), 1955, 381p.

D'Antonio, A.M. & Guerra Neto, E.G. Comportamento de plantas derivadas de seleções do cafeeiro C1195-5-6-2 (c.119) com resistência ao bicho mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Menéville, 1842). 14° Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 1° Congresso Latino Americano de Tecnologia Cafeeira, Campinas, São Paulo, Brasil, 1987, IBC (Rio de Janeiro), p.202-204.

Guerreiro-Filho, O. *Coffea racemosa* Lour Une Revue. Café Cacao Thé, 36(3):171-186, 1992.

Guerreiro-Filho, O. Identification de gènes de résistance à *Perileucoptera coffeella* en vue de l'amélioration de *Coffea arabica* : Potentiel d'espèces diploïdes du genre *Coffea*: genes de *Bacillus thuringiensis*. Thèse de Doctorat, ENSAM, Montpellier, 173 p., 1994.

Guerreiro-Filho, O., Silvarolla, M. B. & Eskes, A. B. Expression and mode of inheritance of

resistance to leaf miner . Euphytica, 105 (1) : 7-15, 1999.

Guerreiro-Filho, O.; Medina-Filho, H.P.; Gonçalves, W. & Carvalho, A. Melhoramento do cafeeiro, XLIII. Seleção de cafeeiros resistentes ao bicho mineiro, Bragantia (Campinas), vol.49, nº 2, 1990, p.2911-304.

Katiyar, K.P. & Ferrer, F. In: International Atomic Energy Agency, Viena, IAEA, 1968, p. 165-175.

Levy, F.A., Bogdan, I., F erraz, J.T., Della Torre, M.A. & Caravalho, A. Precocidade de maturação no cafeeiro. 15° Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Maringá, Paraná, Brasil, 26-29 sept. 1989, Instituto Brasileiro do Café (Rio de Janeiro), p.155-157.

Medina-Filho, H.P., Carvalho, A. & Monaco, L.C. Melhoramento do cafeeiro. XXXVII - Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. Bragantia (Campinas), vol. 36, 1977a, p.131-137.

Medina-Filho, H.P., Carvalho, A. & Medina, D.M. Germoplasma de *C. racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. Bragantia (Campinas),vol. 36, 1977b, p.XLIII-XLVI.

Parra, J.R.P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin - Méneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) visando seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. Revista Brasileira de Entomologia, 29(1):45-76,1985.

Silva, H.L. Número de cromossomos em *Coffea racemosa* Lour. Bragantia (Campinas), vol. 15, 1956, p.XVII-XVIII.

GENETIC IMPROVEMENT OF COFFEE IN INDIA

C.S.Srinivasan, N.S.Prakash, D.Padma Jyothi, V.B.Sureshkumar and V.Subbalakshmi

Central Coffee Research InstituteCoffee Research Station – 577 117 Chikmagalur Dist., Karnataka, India

Although coffee is not an essential commodity for human consumption, its stimulating properties are too well known to ignore its importance in human health, if taken at moderate levels. In India, coffee has a place of pride among plantation crops grown and is traditionally cultivated on the south - western hill slopes since 150 years. As history indicates, the commercial cultivation of coffee in India was started during early 19th century by the European enterpreneurs (Anonymous, 1995). These early coffee plantations have flourished in South India for nearly a century till the leaf rust epidemics were seen and soon the leaf rust became the disease of concern for arabica coffee in view of its high economic importance. Incidentally the largest number of races as many as 30 has been recorded from India. Thus, the fate of coffee industry especially arabica has been largely dependent on release of varieties resistant to rust with acceptable yield levels, bean standards and cup quality. The Central Coffee Research Institute established near Balehonnur in Chikmagalur Dist. of Karnataka state has rendered yeoman services in breeding and release of improved arabica & robusta varieties to the growers from time to time since its establishment in 1925 as "Mysore Coffee Experimental Station". The success achieved in developing rust resistant varieties in India during 1940's (Narasimha swamy, 1961) are pioneering ones, in the history of coffee breeding. It is pertinant to mention that the classical work of W.W.Myne on the existance of physiological races in rust pathogen (Myne, 1932, 1936, 1939); supplemented the breeding efforts not only in India but also elsewhere in the world. This presentation details the objectives and achievements on genetic improvement of coffee in India, performance of the varieties and recent efforts towards further improvement of the proven materials.

Geographical information

In India the major coffee tracts are distributed in hill ranges of Southern part of the country between 9^0 and 14^0 N latitudes and 500-1500 m altitudes; the arabica in high elevations and robusta in low lands. The annual rainfall varies between 1000 – 2500 mm with the temperature ranges between 8^0 C to 34^0 C.

ARABICA IMPROVEMENT

In India, improvement of arabica coffee was started even before the commencement of organised research. Some enterprising planters made frantic efforts to develop superior cultivars through selection / hybridization, in order to tackle the rust disease. In this context, hybrids like 'Hamiltons', 'Jacksons', 'Netrakonda' and selections like 'Coorgs', 'Chicks' and 'Kents' were some important ones which found place in the pages of coffee breeding history. Nevertheless some of these selections are still found here and there in commercial plantations. 'Kents' is one such selection made by a private planter which served as the major source for planting during the 1920s and is still internationally acclaimed for its liquor quality. Inspite of the best efforts of the planting community, plant materials with stable resistance could not be developed due to the ability of the rust pathogen to mutate into virulant races. This necessitated the organised research activities for improvement of arabica coffee in order to evolve superior cultivars with leaf rust resistance, high yielding potential, superior quality and wide adaptability.

Organised research towards genetic improvement :

Since the inception of organized research in coffee in India during 1925, development of improved strains using conventional breeding techniques has been found successful. The success of breeding programme in any crop depends on the exploitation of the available genepool. In India, as a first step towards varietal improvement, initial germplasm with about 250 diverse collections of arabica coffee from different estates were established at CCRI during 1925-40. In subsequent years, several exotic wild collections of coffee and cultivated forms of arabica and robusta were introduced from other coffee growing countries to establish a massive genebank. Presently, the Institute's genebank comprises of over 350 arabica collections, 15 robusta types and 18 different species of *Coffea* and is one of the recognised germplasm centres for coffee in the world. The individual collections of the gene bank have been assessed and genes conferring rust resistance, bush formation,

production potential, quality and drought hardiness have been identified and exploited from time to time in developing 12 superior strains of arabica for commercial cultivation.

Early Indian Selections (1925-1960)

Over the years the simultaneous cultivation of both arabica and other diploid species like robusta and liberica has resulted in the natural hybridization between these types. The early Indian selections like S.288 and S. 795 were evolved from some of these natural hybrids identified during the indigenous germplasm collection.

S. 288 was the first selection released during 1936-37. It was superior to other varieties like 'Chiks' and 'Kents' under cultivation then , by showing resistance to leaf rust races I and II. S. 288 strain was developed by pure line selection from S.26 mother plant a putative natural hybrid betwen liberica and arabica. This selection has the potential to give moderate yields of about 1000 kg/ha but produces defective beans to the tune of 20-30%. To improve the quality aspects of S.288, it was crossed with 'Kents' and S.795 the most popular strain of Indian arabicas was developed. Since its release in 1945-46, S.795 attracted the attention of planters and is still the most popular selection occupying large area (60%) under cultivation. The bushes of this variety are tall, very vigorous, wide spreading with profuse growth and high yield potential of 2000 kg/ha. This selection is widely adpatable to different agro-climatic zones. The beans are oblong, bold representing 70% 'A' grade with good cup quality (Narasimhswamy, 1960).

The $S_{H\,3}$ factor responsible for resistance to several physiologic races of leaf rust pathogen was identified in these strains with possible introduction from *C. liberica*. Thus, these two commercial arabica cultivars of Indian origin differ from the rest of pure arabicas cultivated in the Globe elsewhere (Wagner & Bettencourt, 1965). The S.288 and S.795 remained resistant over a period of time till uncommon rust races VIII, XII and XIV became common on these cultivatrs due to to host preference. This necessitated further work to develop resistance to race VIII the most common and virulant race affecting S.795 populations. As some of the exotic introductions from Ethiopia, like Cioccie, Agaro and S_{12} kaffa were found resistant to race VIII, Sln. 4 was developed following pureline selection in some of these collections. This selection includes three Ethiopian arabica collections viz. Cioccie, Agaro and Tafarikela. Among these, the first two exhibit semi-erect branching, while Tafarikela shows drooping nature. All these are tall types and moderate yielders. Tafarikela is an early ripener. Cioccie and Agaro are resistant to common rust races I, II and also to race VIII. Tafarikela exhibits general tolerence to leaf rust pathogen showing very less rust build up under field conditions, even though susceptible to race I & II under laboratory screening.

Tetraploid interspecific hybrids (1960-1985)

In subsequent years, the spontaneous as well as synthetic hybrids have been exploited. 'Devamachy', a putative robusta x arabica hybrid of indigenous origin, was exploited to develop Selection 5. This selection comprises of two important families derived by crossing Devamachy x Rume Sudan and Devamachy x Indian selection S.333. Devamachy x Rume Sudan line is known for its field tolerance to rust and in recent screening at CIFC, reported to be resistant to Coffee Berry Disease also. However, small sized beans is the negative aspect in this line. The out come of S. 333 x Devamachy cross has been found promising and is characterized by semi-drooping habit with good resistance to leaf rust (85% of the population) and bolder bean size (**Table 1**) (Srinivasan and Ramachandran, 1998). This variety has shown the yield potential of 1300 - 2000 kg /ha under different agroclimatic zones (**Table 2**). In one of the trials this line has recorded an average yield of 2048 kgs/ha (5 years) maintained without any fungicidal sprays (Raju *et al* 1996).

With the experience in exploiting natural hybrids, systematic approach to develop interspecific hybrids through programmed hybridization between tetraploids vs. diploids and diploids vs. diploids was also taken up at CCRI in order to develop Sln. 6 and Sln. 11. The Sln. 6 was evolved by crossing robusta and arabica followed by back crossing to arabica. While developing this hybrid the genome of 2x & 4x occuring in robusta and arabica respectively were not altered. The resultant triploids were back crossed to arabica and the resultant progeny was subjected to pure line selection. S_5 of BC_2 has been released for commercial cultivation as Sln.6. While advancing the generations selection was made to minimise the percentage of empty locules which are otherwise high due to hybridity (Sreenivasan, 1983). The plants of Sln.6 are vigorous, wide speading and tend more towards arabica

phenotype with rust resistance and acceptible quality. The yield potential is around 1500 kg/ ha. Thus, the robusta x arabica hybrid of Indian origin differs from arabustas and other similar hybrids produced elswhere where the

Table 1. Bean grades and quality descriptors of S.2931

Location	Bean grade Percentage					Quality descriptors
	A	B	C	Pb	T	
CCRI	70	8	3	18	1	Raw : Greyish,medium size beans Roast: Even roast, good swelling, Brown centre cut, a few pales Liqour:Fair body, good acidity
RCRS Thandigudi	68	20	-	10	2	Raw : Bluish grey, medium bold beans. Roast: Even roast, good swelling Liquor:Fair to good body, fair acidity, slightly unclear

Table 2. Performance of S.2931 progenies at different locations

Sl. No.	Location	Progeny	Elevation (m)	Average Rainfall (mm)	Mean yield* (Kg/ha)	Remarks
	Pulney Hills					
1	.Pillavali Estate (1972 planted)	F3	900	1551	1340	With Bordeaux spray
2.	RCRS, Thandigudi Chikmagalur	F4	1350	1875	2048	Without Bordeaux (1985 planted) spray
3.	CDF, Arasinaguppe (1980 planted) Coorg	F4	970	1290	1332	With Bordeaux spray
4.	Margolly Estate (1972 planted)	F3	887	1397	1554 1361	With Bordeaux spray Without Bordeaux spray

tetraploid robusta was crossed with tetraploid arabica to derive viable types which mostly tend towards robusta phenotypes. Subsequently crosses between Sln.6 and HDT are also developed and are under evaluation These hybrid progenies (S.4369 and S.4375) are very vigourous with uniform branching pattern
and good fertility status. Both the populations are manifesting high field tolerance to rust (95-97%). In the development of Sln. 11, liberica and eugenioides the two diploid parents were crossed. Interestingly on this diploid F_1 hybrid, an arabica like amphiploid sucker with 44 chromosome number was spotted which bred true by seed and this was further advanced to develop Sln.11. This selection is known to exhibit good tolerance to leaf rust under field conditions but with smaller bean size. Incidentially, its resemblence to arabica is indicative of the probable contribution of these two species for the origin of arabica in nature. (Vishweshwara, 1975).The Sln 11 was further crossed with other arabicas like Ciociee, Tafarikala, HdeT witth multiple objectives of improving bean size, early ripening etc. and the progenies under evaluation. In addition to the above, Hibrido de Timor (HdeT), a natural Robusta x Arabica hybrid was introduced from the Coffee Rusts Research Centre (CIFC), Portugal, in 1961 and manifests high degree of resistance to rust. After pure line selection, this

was released as Sln. 8. Now, HdeT is a major source for rust resistance and widely used in breeding for rust resistance all over the world. Several F_1 hybrids between HdeT and other arabicas were made available by CIFC, Portugal as well as developed in India. All these combinations manifest a high degree of resistance and productivity potential (**Table 3**). The superior combination , HdeT x Tafarikela was released as Sln.9. The bushes are vigorous, semi-erect to drooping with early ripening behaviour and comes up well in marginal areas and supply positions.

Table 3. Performance of F_1 hybrids (HdeT x other arabicas)

F_1 hybri	Parentage	Mean yield (Kg/ha) (6^{th} to 10^{th} Year Avg.)	Rust resistance (%)
S.2790	HdeT x Tafarikala	1760	100.00
S.2792	Tafarikala x HdeT	1258	74.08
S.2794	HdeT x Geisha	1950	98.00
S.2795	HdeT x S.1934	994	87.50
S.2800	HdeT x Bourbon	2162	86.67
S.2803	S_{12} Kaffa x HdeT	1733	90.00

Dwarf and Semi- dwarf hybrids

To meet the planters' demand for dwarf and semi-dwarf varieties suitable for high-density planting, mutants like 'San Ramon' and 'Caturra' have come in handy. San Ramon, a dwarf mutant susceptible to several races of leaf-rust, has been used in a series of crosses with the resistant lines S.795, Agaro and HdeT to produce hybrids which are found suitable for cultivation in low rainfall areas. The cross of Caturra with S 795 and Cioccie made available by CIFC is found promising and named as Sln.10. The catimor hybrid developed as a international collaborative programme between CIFC and other coffee growing countries including India was found promising and released by giving popular name " Cauvery" in 1985. This material became popular in a very short time owing to its precocious bearing nature, high yield potential (2 to 2.5 tonnes / ha) and good response to the intensive cultivation. Though this material was resistant to leaf rust in initial years, break down in resistance was observed due to the appearance of five new rust races (Rodrigues et al 1993) which could infect majority of these populations (Prakash et al 1998). Further, advanced generation of Villasarchi x HdeT, Catuai x Catimor (both supplied by CIFC) and Catimor x Sarchimor developed in India are found promising with high uniformity and vigour, rust reisistance, bold beans coupled with good cup quality (Srinivasan, 1996). These lines are under multilocation evaluation and may form future materials for commercial release.

ROBUSTA IMPROVEMENT

The second important and commercially cultivated species is *Coffea canephora* ('Robusta'). Hence, due importance has also been given for improvement of robusta in India. Robusta coffee possesses several useful characters like high tolerance to leaf rust pathogen, white stem borer, nematode invasion and potentiality to give consistent yields under irrigation. On the other hand, inability to endure long drought, late cropping as well as late stabilization of yields and inferior quality compared to arabica are some of the negative aspects of robusta coffee. Keeping these aspects in view improvement of robusta coffee was undertaken by CCRI .

As Robusta is cross pollinated, breeding methods like mass selection, clonal propagation followed by pedigree selection and interspecific hybridization have been used to evolve three commercial types.

The seedling progenies of 12 high yielding mother plants selected from private estates were evaluated and two materials S.270 and S.274 were found superior and released for commercial cultivation as Sln. 1 (R). These types grow into moderately large trees with

Table 4. Performance of C x R hybrid in different agro-climates and bean grades

Zone	Yield (Kg/ha)	Grade percentages (CxR sibs)		
1. Mudigere	1031	A	-	56.68
2. Koppa	1550	B	-	12.96
3.Coorg	2080	C	-	7.80
		Pb	-	19.46
4. Wynad	1335	BBB	-	3.10

vigorous growth. The fruits and seeds are bold, borne in large clusters. Liquor is rich in body and the cup is neutral. S.274 is preferred over S.270 on account of its bolder beans and it is performing well under irrigated conditions.

Further, 17 superior plants which have yielded twice or more than the family mean yield were identified from the initial single tree progenies of S.267 and S.278 and named as Balehonnur Robusta (BR selection). Based on the individual performance of these clones, BR 9, BR 10 and BR 11 were found to be superior in production and as such seed mixture of these clones was issued for commercial cultivation as Sln.2 (R). Clones were also issued for the establishment of bi/polyclonal gardens. The clones showed high degree of stability for 'A' grade beans The third robusta line developed in the series is C x R hybrid. This is similar to the 'Congusta' hybrid developed in Java earlier (Cramer, 1957). *C.congensis* another diploid species known for its compact bush stature and quality was crossed with S.274 rousta in 1942. Backcrossing to robusta and sib mating was followed to achieve compact stature with bold fruits and seeds (Anonymous 1998). Beans are medium, bold, golden brown and gives soft liquor with flavour nearer to arabica (**Table 4**).

Thus, the continuous efforts of coffee improvement group have been well appreciated by the farming community and it is noteworthy to mention that the arabica varieties developed at this Institute have gradually replaced the old cultivars and presently cover 98% of the total area under arabica coffee. However, due to the long economic life, the intake of improved robusta starins is rather slow. Inspite of this, the C x R hybrid is gaining popularity owing to its superior quality characteristics and is being preferred over other robustas.

NEWER CHALLENGES

The ever increasing racial diversity of the leaf rust pathogen (*Hemileia vastatrix* B. & Br), sudden appearance of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* Ferrari) in 1991 and increased awareness for quality of the produce due to market liberalization pose new challenges. Accordingly, a paradigm shift has been taking place in coffee research. Achieving the durability of rust resistance through gene pyramiding approach development of high yielding strains with a better response to intensive cultivation through multiple crossing programmes, evolving pest resistant and low caffeine lines through biotech/molecular approaches are the best considered emerging trends of the day.

REFERENCES

Anonymous. 1995. Coffee Guide, Coffee Board Research Dept. India. Anonymous. 1998. Coffee Board Research Department, CxR Technical Bull. 1998.

Cambrony, H.R. 1988. Arabusta and other Interspecific Fertile Hybrids. P.263-291. In:R.J.Clarke and R.Macrae (ed.) Coffee, volume 4: Agronomy. Elsevier applied Science Publishers Ltd., 1985, Crown House, Linton Road, Barking, Essex IG 118 JU, England.

Cramer, P.G.S. 1957 in F.L.Wellman, Review of Literature of Coffee Research in Indonesia. SIC Editorial American Institute of Agricultural ciences, Turrialba, Costa Rica.

Mayne, W.W., 1932. Physiologic specialization of *Hemilea vastatrix* B.& Br. Nature 129:510.

Mayne, W.W., 1936. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. 1935-36. Mys. Coffee. Exp. Stn. Bull.14:21.

Mayne, W.W.,1939. Annual report of the Coffee Scientific Officer, 1938-39, Mys.Coffee. Exp. Stn. Bull. 19.

Narasimhaswamy, R.L. 1960. Arabica selection S.795. Its origin and performance. Indian Coffee. 24: 197-204.

Narasimhaswamy, R.L. 1961. Coffee leaf rust disease (*Hemileia)* in India. Coffee. Turrialba. 3:33-39.

Raju.T., C.S.Srinivasan and M.Jagadeesan, 1996. Performance of CCRI released arabica selections in the Pulneys in Tamilnadu. Indian Coffee. LXV(3): 17-20.

Prakash.N.S., C.S.Srinivasan and R.Naidu, 1998. Races of coffee rust (*Hemileia vastatrix)* : Is India a potential source? PLACROSYM XIII. In press.

Rodrigues Jr.,C.J., V.M.P. Varzea, I.L. Godinho, S.Palma and R.C.Raho. 1993. New physiologic races of *Hemileia vastatrix*. ASIC, 15th Colloque, Montpellier, 1993. 318-321.

Sreenivasan, M.S. 1983. Cyto-embryological studies of coffee hybrids. Ph.D. hesis, University of Mysore. rinivasan, C.S. 1996. Current status and future thrust areas of research on varietal improvement and horticultural aspects of coffee. J.Coffee Res. 26(1): 1-16.

Srinivasan, C.S. and M.Ramachandran. 1997. Selection 5B. S.2931 (S.333 x Devamachy hybrid). An old arabica hybrid rediscovered with promising features. Indian Coffee. 61(11) : 4-6.

Vishveswara, S.1975. Coffee: Commercial qualities of some newer
Selections. Plant. Chron. 70, 122.

Wagner, M., and A. J. Bettencourt, 1965. Inheritance of reaction to *Hemileia Vastratrix* Berk.Br. in *Coffea arabica* L. In progress report 1960-1965 Coffee Rust Research Centre, Oeiras, Portugal.

MELHORAMENTO CLÁSSICO DO CAFEEIRO RELACIONADO COM A BIOTECNOLOGIA MODERNA[1]

L. C. Fazuoli [2,3]; M. P. Maluf [2,4]; O. Guerreiro Filho [2]; H. P. Medina Filho [2,3]; M. B. Silvarolla [2]

[1] Com recursos do PNP&D Café/Embrapa.
[2] Pesquisador Científico - IAC – Centro de Café e Plantas Tropicais CP. 28 CEP: 13001-970 - Campinas,SP – Brasil.
[3] Com Bolsa de Pesquisa do CNPq
[4] Bolsista FUNAPE

1. MELHORAMENTO CLÁSSICO.

1.1. Espécies de café e variabilidade.

Existem controvérsias no que se refere à taxonomia das espécies de *Coffea*. Muitas têm sido descobertas no decorrer das coletas efetuadas nas florestas tropicais da África desde 1940. Baseando-se na literatura existente conclui-se que as verdadeiras espécies de *Coffea* são oriundas da parte central e equatorial da África, de Madagascar e ilhas próximas do Oceano Índico. As demais espécies que foram descritas como pertencentes ao gênero *Coffea* e oriundas de regiões asiáticas já não são consideradas como espécies verdadeiras de *Coffea*. No que se refere ao número de espécies existentes, Chevalier (1947) listou 65 espécies, onde são incluídas 24 que pertencem a outros gêneros. Cramer (1957) sugeriu a existência de pelo menos 100 espécies. Purseglove (1968) citado por Wrigley (1988) relatou 50 espécies do gênero *Coffea*, sendo 33 da África Tropical, 14 de Madagascar e 3 das Ilhas Maurício e Reunião. Por outro lado Charrier (1978) listou 56 espécies provenientes de Madagascar. Ao que parece estas espécies estão sendo estudadas, notando-se divergências quanto ao número de espécies verdadeiras de Madagascar. Novas espécies de *Coffea* tem sido descritas por Bridson (1982), principalmente da parte oriental africana. Algumas ainda não foram caracterizadas o suficiente, para serem descritas.

Leroy (1980) reconheceu três gêneros de cafeeiros: *Coffea*, *Psilanthus* e *Nostolachma*. Este último é restrito à Ásia e Indonésia. O mesmo autor distinguiu três subgêneros de *Coffea* e dois de *Psilanthus*.

A classificação mais recente agrupa os cafeeiros em 2 gêneros: *Coffea* e *Psilanthus*. O gênero *Psilanthus* por sua vez é dividido nos subgêneros *Psilanthus* e *Afrocoffea*, e o gênero *Coffea* compreende os subgêneros: *Coffea* e *Baracoffea*. Enquanto o subgênero *Baracoffea* é representado por 7 espécies, o subgênero *Coffea* abriga 80 espécies sendo aproximadamente 25 oriundas da África Continental e 55 de Madagascar (Bridson, 1987; Bridson & Verdcourt, 1988; Bridson, 1944).

As dificuldades de classificação das espécies de *Coffea* decorrem do fato de não existirem coleções com essas espécies descritas, o que seria altamente desejável. No entanto, a maior parte dos países africanos tem imposto sérias limitações à saída de material nativo, como as novas espécies descritas por Bridson (1994) não foram colocadas em coleção nos países onde foram coletadas. Novas coletas de material principalmente dessa região oriental se fazem necessárias . O estabelecimento de Bancos de Germoplasma das espécies conhecidas, e seus derivados a nível mundial e em vários países é muito importante , pois entre as formas selvagens, algumas encerram características altamente vantajosas do ponto de vista de resistência a moléstias e pragas, tolerância à seca e outras variações de ambiente, bem como diferentes características das plantas (sistemas radicular, folhas, flores, frutos, etc). Bancos de Germoplasma de *Coffea* existem na Costa do Marfim, Madagascar, Costa Rica, Colômbia, Brasil e outros países. No entanto em todos estes países, à exceção de *C. arabica* e *C. canephora*, essas coleções contam com poucos exemplares das demais espécies de *Coffea*. No Instituto Agronômico de Campinas foi possível reunir até o presente, 18 das principais espécies do gênero *Coffea* e três do gênero *Psilanthus*. Algumas espécies possuem muitos representantes como é o caso de *C. arabica* e *C. canephora* e outras, pouquíssimos exemplares. Em muitas coleções, alguns cafeeiros não representam a espécie original, pois foram introduzidos por sementes e são na verdade híbridos entre espécies diferentes.

Dentre as espécies conhecidas, *C. arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta) são as duas mais importantes no mercado internacional. Cerca de 70% do café negociado no mundo é arábica e 30% é do tipo robusta. As outras espécies de café têm importância para serem utilizadas em programas de melhoramento de acordo com as características agronômicas que possuem. *C. arabica* é nativa de uma região

restrita, marginal às demais espécies, localizada no sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia (Chevalier, 1947; Charrier, 1978; Bridson, 1982; Leroy, 1982). Trata-se de uma espécie nobre, que produz café de boa qualidade. Existem várias variedades de *C. arabica* e mais de 40 mutantes já descritos (Carvalho *et al.*, 1991). As características desses mutantes são muito variáveis, como por exemplo forma ou coloração de folha, crescimento e forma de planta, tipo de flor e florescimento, forma e coloração dos frutos e sementes, resistência a moléstias, pragas e nematóides.

A outra espécie de interesse comercial (*C. canephora*) tem distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo nas regiões ocidental e central tropical e subtropical de continente africano. Essa ampla faixa compreende a República da Guiné, Libéria, Sudão e Uganda. Elevada concentração de tipos ocorre na República Democrática do Congo (Chevalier, 1947; Charrier & Berthaud, 1985). A variabilidade existente dentro dessa espécie é muito grande em relação ao tamanho e forma da planta, folhas, frutos e sementes. O sistema radicular dos representantes de *C. canephora* é bem desenvolvido e a resistência às principais moléstias e pragas é acentuada. O teor de cafeína e de sólidos solúveis em suas sementes é superior aos encontrados no café arábica.

As outras espécies de *Coffea* não são cultivadas economicamente, mas ocorrem de forma silvestre e possuem variabilidade elevada para muitas características, principalmente resistência às moléstias, pragas e nematóides. O grande inconveniente da maior parte das espécies silvestres de *Coffea* é a quantidade muito baixa de flores, característica esta responsável pela baixa produção de frutos. Algumas das espécies são isentas, ou têm baixo teor de cafeína e sólidos solúveis nas sementes. Outras espécies tem maturação muito tardia ou muito precoce e pelo menos uma, *C. racemosa*, tem resistência à seca e folhas decíduas.

1.2. Biologia da reprodução e relação entre espécies.

A espécie *C. arabica* é tetraplóide com 2n=44 cromossomos, autocompatível e multiplica-se predominantemente por autofecundação, que ocorre em aproximadamente 90% das flores. A taxa de fecundação cruzada natural tem sido avaliada durante anos seguidos em Campinas pelo emprego de diferentes mutantes com genótipos recessivos. O mutante mais apropriado para esta determinação é o cera, que apresenta endosperma de coloração amarelada. Os óvulos do cafeeiro *cera* quando polinizados pelo pólen de cafeeiros de endosperma verde homozigotos dão origem a sementes de cor esverdeada devido ao fenômeno de xênia. De outra parte, os óvulos do cafeeiro *cera* quando polinizados com pólen da própria planta dão origem a sementes com endosperma de cor amarela. Desta maneira, mantendo-se os cafeeiros *cera* rodeados por plantas de endosperma verde e analisando-se as suas sementes, poder-se-ão observar algumas sementes com endosperma verde, resultantes dos cruzamentos naturais. Pelo seu número, avalia-se a porcentagem de fecundação cruzada natural, que é de cerca de 10% em *C. arabica* (Carvalho & Mônaco, 1962). O cafeeiro arábica é portanto autofértil e não tem sido notado efeito desfavorável das autofecundações sucessivas no vigor e na produtividade das plantas. A fertilização em *C. arabica* se dá 24 horas após a polinização, ocorrendo a primeira divisão da célula do endosperma 21 e 27 dias após a fertilização e a primeira divisão do zigoto, 60-70 dias após a polinização (Mendes, 1958).

A espécie *C. canephora* e as outras espécies conhecidas do gênero *Coffea* são diplóides, possuem 2n=22 cromossomos, são autoincompatíveis e multiplicam-se exclusivamente por fecundação cruzada (Berthaud, 1980; Conagin & Mendes, 1961, Devreux *et al.*, 1959). Apenas uma exceção é conhecida. A espécie *C. sp. Meloundou* é diplóide e autocompatível. A incompatibilidade em *C. canephora* foi determinada como sendo do tipo gametofítico, o que também se verifica em *C. dewevrei* e *C. congensis*. Há indicações de que essa incompatibilidade em *C. canephora* seja condicionada por uma série alélica S, em um único loco (Conagin & Mendes, 1961; Devreux *et al.*, 1959). Não se sabe ao certo o número de genes envolvidos na incompatibilidade.

No que se refere a espécies do gênero *Psilanthus*, existem indicações que a espécie *Psilanthus bengalensis*, embora diplóide, seja compatível, devendo multiplicar-se predominantemente por autofecundação, o mesmo ocorrendo com os representantes de *P. travancorensis*. (Medina Filho *et al.*, 1982).

No estudo das relações entre espécies de café, hibridações interespecíficas entre 14 espécies de *Coffea* foram realizadas no IAC por Carvalho *et al.* (1984a) e os resultados indicaram que o sucesso das hibridações entre espécies de uma mesma subseção, nem sempre é maior do que entre as hibridações com cafeeiros de subseções diferentes.

No mesmo estudo não se notou uma tendência geral que relacione o maior sucesso das hibridações com a distribuição geográfica das

espécies. O mesmo ocorreu com espécies que apresentam semelhanças morfológicas.

Outros estudos efetuados por diferentes pesquisadores revelaram que não se pode fazer predições sobre o sucesso das hibridações, viabilidade, fertilidade dos híbridos, baseando-se em semelhanças bioquímicas ou número e comportamento dos cromossomos (Longo, 1972; Medina, 1972 e Maglio, 1983).

1.3. Análises genéticas em *Coffea arabica*, variabilidade e aproveitamento de algumas características no melhoramento.

Dentre as plantas perenes, o cafeeiro *C. arabica* é com certeza a planta melhor estudada no que se refere à herança e relação de dominância de fatores genéticos. Para estes estudos, tem-se utilizado o cultivar Arabica (Nacional ou Típica) de *C. arabica* como padrão.

As pesquisas sobre herança das principais características das variedades de *C. arabica* têm-se mostrado importantes na obtenção de novos cultivares, através de recombinações genéticas.

No decorrer de 67 anos de observações encontraram-se aproximadamente 42 mutações que permitiram efetuar análises genéticas. Apenas os fatores genéticos anômala e anormalis revelaram ser ligados (Carvalho, 1960). Encontraram-se ainda anomalias que parecem ser de caráter citológico e outras de origem citoplásmica. Os fatores estudados afetam características da planta como altura, tipo de ramificação e das folhas, flores, frutos (Carvalho *et al.*, 1991) e sementes, além de resistência a moléstias e pragas. Vários desses fatores revelaram-se dominantes, outros recessivos ou com dominância incompleta, em relação aos alelos do cultivar Arábica (Carvalho, 1958; Krug & Carvalho, 1951). Dentre os fatores que afetam a altura das plantas, destacam-se o Caturra (Ct), São Bernardo (Sb), Vila Lobos (Vl) e San Ramón (Sr), todos dominantes e independentes. Esses fatores, de grande interesse econômico, contribuem para a redução do comprimento dos internódios da haste principal e dos ramos laterais, resultando em cafeeiros de menor porte e de aspecto compacto (Carvalho *et al.*, 1984b). Um exemplo do aproveitamento do fator Caturra foi a obtenção dos cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo de porte baixo, vigorosos e altamente produtivos, largamente plantados no Brasil e no exterior (Carvalho & Mônaco, 1972; Fazuoli, 1986; Carvalho & Fazuoli, 1993). Por sua menor altura, a colheita e os tratos fitossanitários são facilitados e menos dispendiosos. Verificou-se, também, que vários fatores têm efeito pleiotrópico marcante, como a laurina (lr), que, além de afetar o porte e a altura de planta, tamanho das folhas, forma e tamanho dos frutos e das sementes, reduz o teor de cafeína nas sementes (Krug *et al.*, 1959; Carvalho *et al.*, 1986).

O fator genético cera (ce) mostrou-se valioso, em vista do fenômeno de xênia que apresenta. Contribuiu para demonstrar, pela primeira vez, que a semente de café é formada por endosperma verdadeiro e foi muito utilizado para determinação da taxa de fecundação cruzada natural (Krug & Carvalho, 1939, 1951). Como apresenta sementes amareladas, serviu também para demonstrar que a cor verde da semente normal não é devida aos ácidos clorogênicos, pois as sementes cera têm a mesma constituição com relação a esses compostos que as verdes (Carelli *et al.*, 1974). Resumos de várias das análises genéticas efetuadas em *C. arabica* foram publicados ao longo dos anos (Carvalho & Krug, 1949; Carvalho, 1958; Krug & Carvalho, 1951; Carvalho *et al.* 1991).

No que se refere à resistência a moléstias foram detectadas em *C. arabica* fontes de resistência a ferrugem, a mancha aureolada (Pseudonomas syringae pv. garcae), CBD ou antracnose dos frutos (Coffee Bery Discase, ocasionada por *C. coffeanum* atualmente designado *C. kahawae*) (Bettencourt & Carvalho, 1968; Moraes *et al.*, 1974; Van der Vossen & Walyaro, 1980). Em relação a nematóides fontes de resistência têm sido encontradas em materiais procedentes da Etiópia (Fazuoli, 1981).

Como se pode observar em *C. arabica* existe uma variabilidade razoável para algumas características, que tem sido utilizada em programas de melhoramento. No entanto para características de resistência a moléstias, pragas e nematóides, a variabilidade é pequena. Na incorporação em *C. arabica* desses genes que conferem estas características deve-se utilizar preferencialmente espécies diplóides.

1.4. Aproveitamento de características de espécies diplóides de *Coffea* no melhoramento de *C. arabica*.

O modelo de classificação informal das espécies, propostos por Harlan e De Wet (1971) aplicado ao gênero *Coffea* indicou um grande potencial para o melhoramento concentrado na reserva gênica secundária (Medina Filho *et al.*, 1984). As espécies *C. canephora*, *C. congensis*, *C. racemosa* e *C. dewevrei*, atualmente designada por *C. liberica var. dewevrei* que pertencem a essa reserva, vêm sendo aproveitadas como importantes fontes de resistência a pragas, moléstias, nematóides e a condições adversas de

ambiente. Um exemplo é o desenvolvimento no IAC dos cultivares Icatu Vermelho , Icatu Amarelo e Icatu Precoce, provenientes do cruzamento de *C. arabica* e *C. canephora* e com resistência a *Hemileia vastatrix* (Mônaco *et al.*, 1974; Fazuoli, 1991; Carvalho & Fazuoli, 1993). Trata-se de um exemplo significativo do aproveitamento de uma espécie diplóide no melhoramento do cafeeiro *C. arabica*.

A utilização da espécie *C. canephora* também tem sido efetuada através do Híbrido de Timor, provavelmente um híbrido natural, entre *C. arabica* e *C. canephora* (Bettencourt, 1973). O uso do Híbrido de Timor e derivados é mais simples em relação ao aproveitamento do híbrido Arabusta (F_1 de *C. arabica* x *C. canephora*) pois o Híbrido de Timor, possui fenótipo de *C. arabica*, tem 44 cromossomos nas células somáticas, é autofértil e está aparentemente estabilizado (Rijo, 1974). Os cultivares Obatã (IAC 1669-20), Tupi (IAC 1669-33) e IAPAR 59, produtivos, de porte baixo e com elevada resistência a ferrugem são exemplos do aproveitamento do Híbrido de Timor e indiretamente de *C. canephora* (Fazuoli *et al.*, 1996; IAPAR, 1993). É interessante ressaltar que determinadas progênies de *C. canephora* constituem também fontes de resistência a *Colletotrichum coffeanum*, atualmente conhecida por *C. kahawae*, moléstia designada por CBD (Coffee Berry Disease) que ataca os frutos de café, provocando a sua queda. Esta moléstia é muito grave e comum em países africanos. (Carvalho *et al.*, 1976; Van der Graaf, 1981; Van de Vossen e Walyaro, 1981). A espécie *C. canephora* também apresenta resistência aos nematóide *Meloidogyne exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis* e *Pratylenchus coffeae*. O porta enxerto Apoatã (IAC 2258) resistente a vários nematóides vem sendo a solução para a manutenção da cafeicultura em várias regiões do Brasil, onde ocorre a presença de nematóides. Dessa maneira, *C. canephora* é amplamente utilizada no programa de melhoramento do Instituto Agronômico de Campinas, como porta enxerto ou como fonte de resistência a estas moléstias e nematóides. (Fazuoli, 1981; Fazuoli *et al.*, 1984, Carvalho & Fazuoli, 1993).

A espécie *C. racemosa*, pertencente ao grupo secundário, de reserva gênica de *Coffea*, cruza-se bem com *C. arabica* produzindo triplóides naturais ou artificiais com facilidade. Tem sido utilizada como fonte de resistência ao bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*) e à seca. Como o período de maturação dos frutos de *C. racemosa*, em Campinas - SP, é bastante reduzido (2 a 3 meses), esta característica vem sendo utilizada no desenvolvimento de cultivares de *C. arabica* com maturação precoce.

Uma outras espécie do grupo secundário de reserva gênica é *C. dewevrei* ou *C. liberica var. dewevrei*, que além de ter boa produção, possui resistência ao agente da ferrugem, nematóides e bicho mineiro. Apresenta maturação bem tardia, levando um ano desde o florescimento até a maturação dos seus frutos e tem endocarpo mais espesso, que pode se constituir em uma barreira física que dificultaria a penetração da broca do café (*Hypotenemus hampei*) em seus frutos.

C. congensis, também do segundo grupo de reserva gênica vem sendo utilizada em sua forma tetraplóide. Esta espécie além de possuir exuberante sistema radicular e boa produção, é resistente aos nematóides *M. exigua* e *M. incognita* (Fazuoli *et al.*, 1983) e a *H. vastatrix*. Observações atuais efetuada pelos autores revelam que os cafeeiros utilizados neste trabalho eram provavelmente híbridos com *C. canephora* . A espécie *C. congensis*, segundo Chevalier (1947), em seu habitat natural fica submersa em água por algum tempo. Este aspecto representa uma vantagem, pois o excesso de umidade do solo é prejudicial aos cafeeiros da espécie *C. arabica*.

Outra espécie que vem sendo utilizada é *C. stenophylla*, pertencente ao grupo terciário de reserva gênica. Esta espécie é praticamente imune ao bicho mineiro. No entanto, o seu uso é limitado pela dificuldade de obtenção de sementes através das hibridações com *C. arabica* (Carvalho & Mônaco, 1967). Neste caso é indicado o uso de métodos mais sofisticados que possam auxiliar a utilização dessa espécie em programas de melhoramento, tais como cultura *in vitro* de embriões ou fusão de protoplastos (Sondahl *et al.*, 1980).

A espécie *C. salvatrix*, pertencente ao grupo terciário de reserva gênica também está sendo aproveitada no programa de melhoramento do IAC visando resistência a *P. coffeella*. Cafeeiros tetraplóides de *C. salvatrix* foram cruzados com *C. arabica* com a finalidade de transmitir essa resistência. No entanto, uma atenção especial deve ser dispensada a utilização de *C. salvatrix*, pois a espécie é altamente suscetível à saúva (Mazzafera, 1991).

Em todos os projetos em que as espécies silvestres são aproveitadas, há uma necessidade de se realizarem provas de qualidade de bebida para fins de seleção, pois apenas *C. arabica* produz bebida considerada de boa qualidade (Teixeira *et al.*, 1974).

Outra característica importante, avaliada no programa de melhoramento do cafeeiro no IAC é

o teor de cafeína, que é um dos componentes químicos de grande interesse, devido ao efeito estimulante que apresenta. Reduzir ou aumentar o seu teor é importante para atender distintos nichos de mercados. A redução poderá ser conseguida pelo emprego, nas hibridações, de cafeeiros silvestres de Madagascar sem cafeína, ou então pela transferência do gene recessivo laurina (lr) de *C. arabica* para os cultivares comerciais, uma vez que esse fator reduz à metade o teor de cafeína (Carvalho *et al.*, 1965; Carvalho *et al.*, 1983; Charrier & Berthaud, 1975). O desenvolvimento de cultivares de *C. canephora* sem cafeína vem também sendo estudado por Ky *et al* (1999). Os autores têm utilizado a espécie *C. pseudozanguebarie* nos cruzamentos, pela ausência de cafeína nas sementes. Algumas espécies do gênero *Psilanthus*, como *P. bengalensis* e *P. travancorensis*, que não possuem cafeína em suas sementes podem também ser utilizadas em programa similares. De particular interesse foi a obtenção do híbrido de *C. arabica* com *P. bengalensis* (Charrier, 1978). No entanto, a utilização de espécies de outros gêneros no melhoramento do cafeeiro é uma tarefa difícil e demorada pois as barreiras genéticas são maiores. Para aumentar o teor de cafeína nas sementes pode-se utilizar cruzamentos com a espécie *C. canephora*, onde ocorre considerável variabilidade para esta característica (Charrier & Berthaud, 1975).

Devido ao fato da espécie *C. arabica* ser alotetraplóide, autofértil e autógama e as outras espécies do gênero Coffea serem diplóides, autoincompatíveis e de polinização cruzada, ocorrem problemas no aproveitamento das espécies silvestres, tanto no nível diplóide como tetraplóide. Apesar de haver boas possibilidades de se utilizarem triplóides, o caminho mais seguro talvez seja o da duplicação do número de cromossomos das espécies diplóides para posterior cruzamento.

Na utilização de indivíduos triplóides, em cruzamentos ou retrocruzamentos, estes deverão sempre ser utilizados como genitores. Para o aproveitamento no nível tetraplóide, as sementes ou plântulas das espécies silvestres deverão ser submetidas ao tratamento com colchicina para a duplicação do número de cromossomos. Nas hibridações os cafeeiros tetraplóides deverão ser utilizados como planta masculina, com a finalidade de evitar ou diminuir o aparecimento de indivíduos aneuplóides na descendência.

Além dos inúmeros exemplos da utilização com sucesso do germoplasma de *Coffea* em programas de melhoramento, a reserva gênica presente em coleções deverá ainda contribuir intensivamente para o desenvolvimento de novos cultivares com características específicas, principalmente em relação à resistência aos nematóides ou outros problemas fitossanitários, ou ainda, para atender novas exigências do mercado consumidor.

2. BIOTECNOLOGIA MODERNA

Dentre as técnicas de biotecnologia moderna que poderiam ajudar no programa de melhoramento do cafeeiro destacam-se a cultura de tecidos, a transformação genética e as de marcadores moleculares.

2.1. Cultura de Tecidos

O termo cultura de tecidos corresponde a um conjunto de técnicas que possibilitam o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, a partir de partes de plantas adultas. Culturas de tecidos têm sido estabelecidas com sucesso para inúmeras espécies cultivadas e selvagens a partir dos mais variados tecidos e órgãos, como é o caso de folhas, embriões, anteras, pólen. A utilização dessas técnicas permitiu práticas diversas, como micropropagação de genótipos de interesse e de difícil cultivo, manutenção facilitada de bancos de germoplasma, produção de haplóides e diplóides homozigotos, transformação de genótipos, entre outros. Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas da biologia molecular, há uma necessidade crescente de se estabelecer metodologias eficientes de cultura de tecidos para todos os cultivares comerciais beneficiando amplamente os programas de melhoramento genético.

As primeiras tentativas de cultivo *in vitro* constituíam-se na micropropagação em cultura de explantes, nodos vegetativos, ou meristemas apicais. Este tipo de cultura é mais eficiente para produção de plantas em pequena escala, como por exemplo para multiplicação de genótipos especiais, ou para o estabelecimento e manutenção de coleções *in vitro*.

O método de cultura deve ser cuidadosamente escolhido de acordo com o objetivo em vista e das condições experimentais previamente testadas e eficazes para cada espécie. Por exemplo, para usos de maior demanda, tais como a propagação de cultivares, a metodologia mais utilizada é a embriogênese somática. De maneira geral, a cultura pode ser iniciada a partir de um fragmento de tecido ou órgão, que em meio de cultura irá se desenvolver em uma massa amorfa de crescimento contínuo e indiferenciado. Esta massa, denominada calo, pode ser mantida neste estado indefinidamente através de repicagem. A diferenciação em tecidos e órgãos, e a regeneração

de plantas adultas é feita através da adição de reguladores de crescimento apropriados (hormônios vegetais) ao meio de cultura. Uma variação dessa metodologia é a cultura de protoplastos. Neste caso, a cultura é iniciada a partir de células vegetais em suspensão, que tiveram a parede celular removida. Este tipo de célula pode ser utilizada em experimentos de transformação. A diferenciação e regeneração de plantas é posteriormente realizada seguindo os procedimentos de embriogênese somática.

Um outro tipo de cultura pode também ser iniciado a partir de anteras intactas ou de micrósporos. A cultura de anteras tem grande importância em programas de melhoramento pois possibilita o desenvolvimento de plantas haplóides. Além disso, micrósporos em cultura podem ser duplicados com a utilização de colchicina, que irão regenerar plantas diplóides homozigotas.

Em café, vários esforços têm sido efetuados para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de várias espécies do gênero *Coffea*. A primeira tentativa bem sucedida de regeneração de plantas em *C. arabica* foi realizada em 1975, a partir de embriogênese somática direta (Herman & Haas, 1975). Desde então vários trabalhos foram realizados na tentativa de se estabelecer as condições ideais de cultivo (revisto em van Boxtel, 1994). Atualmente a regeneração de plantas adultas a partir de calos embriogênicos é obtida com sucesso em *C. canephora* (van Boxtel, 1994). Em *C. arabica* a freqüência de obtenção de embriões e regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos é baixa e depende do genótipo (van Boxtel & Berthouly, 1996). Esta regeneração, no entanto, não foi possível quando a cultura foi iniciada com protoplastos isolados a partir de folhas de *C. arabica* (van Boxtel, 1994). Recentemente, em outro tipo de experimento, a androgenesis têm sido estabelecida para a variedade Catimor. Neste caso, a cultura foi iniciada com botões florais, as anteras e micrósporos foram isolados e cultivados em diferentes meio de cultura. A regeneração de plantas a partir de células de anteras foi alcançada com sucesso (Carneiro & Antão da Silva, 1999). Esse experimento abre uma porta importante para o melhoramento do cafeeiro, uma vez que a produção de plantas haplóides representa uma economia de tempo e aumenta a eficiência na geração de híbridos.

A utilização de técnicas de cultura de tecidos em café pode ser uma ferramenta essencial para solução de problemas encontrados pelos programas de melhoramento. Um deles, a baixa variabilidade genética para resistência a moléstias, pragas e nematóides presente em *C. arabica*, pode ser potencialmente contornada através da introdução de genes de outras espécies, via transformação genética. Para tal, é fundamental o estabelecimento de uma metodologia eficaz, que permita a determinação da influência de fatores, tais como tipo e idade do tecido iniciador, composição do meio de cultura, período de tempo entre a embriogênese e a regeneração de plantas adultas, entre outros, para o cultivo *in vitro* de espécies de *Coffea*. Outro aspecto que pode ser resolvido com esta tecnologia é a propagação e conservação de germoplasma em café. Atualmente, a propagação é feita principalmente através de sementes. A utilização da embriogênese somática para a obtenção de embriões que podem ser multiplicados em larga escala em bioreatores, e posteriormente germinados, a chamada micropropagação, já vêm sendo pesquisada. Em experimentos, plantas originadas a partir de embriões somáticos apresentaram desenvolvimento semelhante ao de plantas originadas de plantio por sementes (Sondahl *et al.*, 1999). A falta de biofábricas especializadas em café, o alto custo de produção e ausência de dados com relação ao efeito do processo sobre a qualidade da bebida representam alguns dos fatores limitantes à utilização da micropropagação em cafeeiros.

2.2. Transformação genética

Entende-se por transformação genética a modificação de genótipos através da introdução de genes específicos, visando uma alteração programada do indivíduo transformado. No caso de transformação de tecidos vegetais, estes genes podem estar relacionados com características de interesse agronômico, tais como resistência a doenças e pragas, controle da síntese de hormônios e substâncias de interesse comercial. Atualmente, com a constante divulgação de organismos transformados, ou geneticamente modificados, a compreensão do potencial das metodologias utilizadas para transformação se torna extremamente importante.

O método de transformação utilizado em plantas varia de acordo com as características morfológicas e fisiológicas da espécie em questão. O método mais eficiente e de menor custo é a utilização da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria é um patógeno natural de plantas, que promove o crescimento desordenado de células vegetais infectadas, levando à formação de galhas. Essa alteração é resultante da ação de genes encontrados em um plasmídio da bactéria e que codificam reguladores de crescimento. Durante a infecção, esse genes são transferidos

para o genoma da planta, sendo assim ativados. Para sua utilização em experimentos de transformação, os plasmídios de *A. tumefaciens* são modificados em laboratório, recebendo o gene de interesse a ser introduzido na planta, e também genes marcadores para a seleção do material transformado. A transformação através desta metodologia é normalmente feita em células vegetais em cultura, as quais serão depois selecionadas para a presença do plasmídio bacteriano e regeneradas em plantas transformadas. Em café, plantas têm sido transformadas através desta metodologia de maneira eficiente. O gene *CryIA(c)* que confere resistência a *P. coffeella*, isolado de *Bacillus thuringiensis*, foi introduzido em *C. arabica e C. canephora* e as plantas regeneradas estão sendo testadas para a resistência ao bicho-mineiro (Leroy *et al.*,1999).

Uma outra metodologia utilizada com sucesso para transformação de café é a biobalística ou bombardeamento de tecidos vegetais. Neste caso, os genes de interesse e os genes marcadores são introduzidos em tecidos vegetais através de uma forte pressão, exercida por gás hélio comprimido. Esse bombardeamento é realizado em um equipamento específico, onde o DNA, associado com micropartículas, é colocado na direção do jato de gás e direcionado sobre o tecido a ser transformado. Além de uma alta eficiência de transformação, outra vantagem deste método é que o tecido transformado não sofre grandes danos mecânicos. Até o momento, testes realizados com vários tecidos de *C. arabica*, tais como folhas intactas, células em suspensão e calos embriogênicos foram promissores (van Boxtel, 1994). Nestes experimentos foi possível se detectar a expressão transiente do gene marcador GUS.

O impulso para o desenvolvimento de metodologias para transformação veio a partir do conhecimento cada vez mais complexo da estrutura molecular do gene. As técnicas de biologia molecular possibilitaram isolamento e clonagem de genes, identificação de regiões reguladoras e mecanismos de ação gênica. Em café, alguns exemplos representam possibilidades de utilização dessa tecnologia em melhoramento. Em um deles, a resistência ao bicho-mineiro pode ser obtida através da utilização de genes isolados de *B. thuringiensis*. Estes genes, relacionados com a síntese de toxinas com poder inseticida, foram transferidos para células em cultura (Leroy *et al.*, 1999). Em um outro tipo de experimento, o gene de café que codifica a xantosina- N7-metiltransferase, enzima envolvida na biosíntese de cafeína, foi introduzido em células. Porém, o sentido da seqüência foi invertido, de maneira que o RNA produzido será complementar ao RNA do gene normal, e irá portanto se parear com este. Desse modo, não haverá síntese da enzima, e consequentemente a síntese de cafeína pode ser bloqueada (Moisyadi *et al.*, 1999).

A agricultura atual exige cada vez mais variedades com uma maior plasticidade agronômica. As novas técnicas de biologia molecular, associadas com cultura de tecidos e sistema de transformação eficazes, permitem a obtenção de genótipos bem específicos, de maneira controlada, isto é, sem a introdução de características indesejáveis. No caso do café, a biotecnologia pode contribuir muito em programas de melhoramento genético pois as pesquisas feitas até o momento demonstram a existência de um potencial para a transferência de genes de interesse, de maneira mais rápida, onde não seria necessário a realização de retrocruzamentos. No entanto, o sucesso deste tipo de abordagem em melhoramento depende de um conhecimento profundo não só dos genótipos a serem avaliados, mas também dos mecanismos de ação e tipo de herança dos genes de interesse. Além disso, um programa de seleção e análise de progênies é fundamental para que as variedades obtidas possuam realmente as características desejadas.

2.3. Marcadores Moleculares

O desenvolvimento da técnica da eletroforese, que possibilita a separação e visualização de moléculas diversas, representou a possibilidade de se conhecer e avaliar o genótipo de indivíduos. A análise de padrões eletroforéticos permite a caracterização de locos gênicos, com relação ao seu padrão de herança, número e freqüência de alelos em uma população. Desta maneira, é possível a identificação de marcadores moleculares, associados a genótipos específicos.

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo originado da expressão de um gene ou de um fragmento específico de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Os primeiros marcadores utilizados em análises genéticas foram as isoenzimas (Tanksley & Ortom, 1983). Atualmente uma gama de marcadores moleculares têm sido identificados, através de técnicas que permitem uma ampla caracterização do polimorfismo genético existente em diferentes variedades de plantas. Esses marcadores representam uma ferramenta importante em programas de melhoramento assistido e na identificação de variedades. Vários programas de melhoramento de plantas cultivadas têm utilizado os mapa genético-moleculares

gerados por esses marcadores, em conjunto com métodos tradicionais de melhoramento, para a seleção de cultivares de interesse econômico (Rafalski & Tingey, 1993; Lashermes *et al.*, 1997 a).

O primeiro marcador de DNA desenvolvido foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), cujo polimorfismo está baseado no comprimento dos fragmentos digeridos por enzimas de restrição (Botstein *et al.* 1980). O desenvolvimento do princípio de reações de polimerização em cadeia (PCR - *Polymerisation of Chain Reaction*) possibilitou a identificação de marcadores obtidos a partir da amplificação de seqüências aleatórias no genoma. Estas sequências amplificadas variam em tamanho e número dependendo do genótipo analisado. Dessa forma, populações que apresentam grande variabilidade genética possuem padrões diversificados de marcadores. Já populações com baixa variabilidade genética apresentam padrões constantes de marcadores. Os métodos de obtenção de marcadores mais utilizados em plantas são o RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), inicialmente utilizado por Williams *et al.*(1990) e Welsh & McClelland (1990); o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphic*), desenvolvida e aplicada por Vos *et al.* (1995); e os microsatélites (Tautz, 1989; Weber & May, 1989). De maneira geral, todos estes métodos buscam avaliar a variabilidade genética através do mesmo princípio, que é a existência de polimorfismos em regiões do DNA, que são ou não conservados em uma determinada população. A diferença entre eles está na especificidade e abrangência de detectar esse polimorfismo, e principalmente no custo experimental. Assim, marcadores de RAPD são os mais simples e baratos de serem obtidos; porém em determinadas situações, como é o caso de espécies com baixa variabilidade genética, não conseguem identificar polimorfismos que permitam a identificação de diferentes genótipos. Já os microsatélites têm uma boa abrangência, porém com custo elevado.

Vários experimentos têm sido conduzidos na tentativa de se estabelecer um mapa genético-molecular para as espécies de café. No entanto, a variabilidade genética encontrada em uma população de *C. arabica* não é muito grande, o que dificulta a identificação de marcadores genéticos necessários em programas de melhoramento. Diversos cultivares de *C. arabica* têm sido estabelecidos até o momento, através de melhoramento genético clássico, resultantes de cruzamentos com outras espécies do gênero *Coffea* (Sondhal & Lauritis, 1992) . Esses cruzamentos interespecíficos, associados com uma taxa esperada de alogamia levam a acreditar que exista um certo nível de polimorfismo molecular entre as variedades de *C. arabica* .

O estabelecimento de mapas genéticos de café baseados em isoenzimas e RFLPs, tanto de DNA total quanto de DNA de cloroplasto, não foram bem sucedidos devido ao baixo índice de polimorfismo observado (Paillard *et al.*, 1996; Lashermes *et al.*, 1996a). Um outro marcador analisado para caracterizar as diferentes espécies de café foi a seqüência entre as regiões codificadoras dos genes *18s* e *26s*, conhecida como ITS (*internal transcribed spacer*). No estudo de Lashermes *et al.* (1997b), várias espécies e variedades de *Coffea* foram avaliadas quanto ao polimorfismo nas ITS. Os resultados indicam que as ITS podem representar um marcador inter e intraespecífico, uma vez que polimorfismos nestes níveis foram observados. Até o presente a técnica de RAPD foi a que mais permitiu o estabelecimento do nível de diversidade genética entre vários cultivares pertencentes a *C. arabica* e *C. canephora*, determinando marcadores específicos para as variedades analisadas (Lashermes *et al.*., 1996b). No entanto, a variação intraespecífica não foi estabelecida para *C. arabica* (Orozco - Castillo *et al.*, 1994). Baseando-se nestas informações é possível inferir que para a identificação de polimorfismos em *C. arabica* devem ser utilizadas metodologias que permitam a revelação de um número maior de locos, como é o caso dos AFLPs e microsatélites.

Além da sua utilização para identificação de espécies e variedades, os marcadores podem representar uma ferramenta importante em programas de melhoramento. Neste caso, a identificação de marcadores moleculares que co-segreguem com características agronômicas desejáveis, tais como resistência a doenças e pragas, produtividade, qualidade de bebida, pode servir como instrumento de seleção assistida. Este tipo de análise é importante em espécies com ciclo de vida longo, como o café, pois a identificação das progênies desejadas pode ser realizada nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta. Desta forma, não é necessário que todas as progênies sejam plantadas e avaliadas em campos experimentais, o que representa uma grande economia de tempo, espaço físico e recursos.

3. POSSIBILIDADES DO USO DA BIOTECNOLOGIA MODERNA EM CAFEEIROS.

3.1. Exemplos de utilização da cultura de tecidos

3.1.1. Cultura de folhas

A cultura de folhas do cafeeiros poderia ser utilizada para estudos de variação somaclonal ou micropropagação. No entanto a utilização da embriogênese somática direta através de bioreatores de imersão temporária ou permanente, biofábrica, seria interessante para propagação de clones de *C. canephora* livres de moléstias, de plantas especiais geralmente híbridos com resistência múltipla (à ferrugem, aos nematóides e ou ao bicho mineiro), de clones de *C. canephora* com resistência a várias espécies e ou raças de nematóides.

3.1.2. Cultura de anteras

A cultura de anteras seria interessante para a produção de plantas haplóides. No caso de espécies diplóides poderiam ser obtidas posteriormente plantas diplóides homozigotas possibilitando análises genéticas nestas espécies autoincompatíveis e produção de híbridos F_1 de *C. canephora* 100% resistentes a nematóides.

3.1.3. Cultura de embriões

Embriões originados a partir de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos e que apresentam dificuldades em seu desenvolvimento natural poderiam crescer e tornarem plantas quando colocados em culturas *in vitro*. É o caso, por exemplo, de cruzamentos de *C. stenophylla* ou. *P. bengalensis* com *C. canephora* ou *C. arabica* (Carvalho & Mônaco, 1967; Charrier, 1978).

3.1.4. Preservação de células e propágulos

A preservação de células ou propágulos relaciona-se com a conservação *in vitro* de recursos genéticos de espécies, híbridos interespecíficos, haplóides, etc , mantendo assim um banco de germoplasma em condições de laboratório.

3.2. Transformação de plantas

A transformação utilizando genes de bactérias, fungos e vírus poderia ser utilizada em café principalmente nos casos da transferência de características (genes) não encontradas em espécies selvagens de café. Um exemplo é o caso da resistência à broca do café (*H. hampei*), pois até o presente não foram identificadas fontes de resistência a esta praga no germoplasma de café. Há informações de que pesquisadores da Colômbia do CENICAFÉ conseguiram clonar genes de *Streptomyces sp.* que produzem quitinase. Esta deve atuar na quitina do besouro e portanto poderia ser usado no controle da broca do café.

Como existem fontes de resistência para outras pragas nas espécies diplóides estes genes estão sendo transferidos para *C. arabica* no melhoramento clássico (cruzamentos, autofecundações e retrocruzamentos). Como exemplo pode-se citar o desenvolvimento de cultivares com resistência e tolerância a *P. coffeella* (bicho mineiro) já em fase final de avaliação (Guerreiro Filho *et al.* , 1999). Apesar disso, alguns pesquisadores estão incorporando genes Bt em cultivares de café (Leroy *et al.* , 1999).

Um outro uso de transformação está relacionado com a obtenção de cafeeiros tolerantes aos herbicídas. Neste caso o interesse seria maior para as firmas que vendem seus produtos.

É importante ressaltar o uso da transformação sem que esta envolva a introdução de genes estranhos ao genoma do café como é o caso da manipulação genética da síntese do etileno (Neupane *et al.*, 1999) do bloqueio do metabolismo da síntese de cafeína, através da inserção de seqüências invertidas (Moisyadi *et al.* , 1.999) que neste caso estariam relacionados com a qualidade do produto.

Finalmente o uso da transformação terá um grande avanço em café quando for possível desses conhecer o genoma de *C. arabica* e espécies diplóides e houver possibilidades de clonar genes específicos de espécies diplóides que poderão ser transferidos para *C. arabica*. A utilização desses cultivares não representaria maiores riscos como acontece com a introdução de genes de bactérias, fungos e vírus, cujos danos ao meio ambiente e à saúde humana não foram ainda suficientemente avaliados.

3.3. Utilização de marcadores moleculares

Como exemplos da utilização de marcadores moleculares em café pode-se citar:

(a) Caracterização de cafeeiros (espécies, híbridos, cultivares, clones, etc.), visando conhecimento do material e proteção com identificação mais segura. Na caracterização de cafeeiros tem-se utilizado descritores relativo às características morfológicas da planta, folhas, flores, frutos e sementes. Características agronômicas, tecnológicas e resistência ou tolerância a fatores adversos (moléstias , pragas, nematóides e ambientais) também vêm sendo utilizadas. Atualmente o uso de técnicas modernas de extração de DNA e de marcadores moleculares poderá permitir uma melhor caracterização de cafeeiros mutantes de *C. arabica* e principalmente das espécies diplóides de *Coffea* e outros gêneros.

a) Seleção assistida utilizando marcadores moleculares. Neste caso procura-se associar resistência a ferrugem, nematóides, maturação, propriedades organolépticas, etc com características de melhor definição e mais fácil avaliação.
b) Análises genômicas e avaliação da divergência genética. Para tal pode-se pensar em estabelecer o genoma de *C. arabica* e principais espécies diplóides ou o genoma de alguma moléstia, praga ou nematóide importante.
c) A hibridação somática entre espécies de café também seria interessante e possível com o uso da técnica de marcadores moleculares.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao fato de que os cultivares de café disponíveis no mercado são altamente produtivos, pode-se afirmar que as tendências atuais no melhoramento do cafeeiro estão relacionadas com resistência a moléstias, pragas e nematóides, resistência e ou tolerância a condições adversas do ambiente, melhor sistema radicular, a arquitetura da planta, com a redução do seu porte e uma melhor qualidade da bebida. Na maioria dos casos o melhoramento clássico foi e contínua sendo importante. No entanto a possibilidade do uso da biotecnologia moderna é evidente com a utilização de culturas de tecidos, de marcadores moleculares e de transformação. O uso da transformação em café utilizando genes clonados de bactérias, fungos e vírus deve ser analisado sob dois aspectos, o científico e o de interesse da comunidade. O aspecto científico refere-se a um avanço inevitável nas próximas décadas, mas o aspecto de interesse da comunidade requer mais reflexões, pois no momento o ambiente não é favorável à utilização deste tipo de transformação. Por outro lado a utilização de cultura de tecidos e especialmente de marcadores moleculares ocupará, sem dúvida nenhuma, uma posição de destaque nos trabalhos de melhoramento do cafeeiro e poderá proporcionar grandes avanços em um futuro bem próximo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berthaud, J. 1980. L'incompatibilite chez *Coffea canephora* methode de test et determinisme genetique. Café, Cacao, Thé 24: 267-274

Bettencourt, A. J. 1973. Considerações gerais sobre o híbrido do Timor. Campinas, Instituto Agronômico, Circ. n.º 23. 20 p.p.

Bettencourt, A. J. & Carvalho, A. 1968. Melhoramento do cafeeiro visando resistência à ferrugem. Bragantia , 27:35-68.

Bridson, D. M. 1982. Studies in *Coffea* in *Psilanthus* (Rubiaceae subfam. *Cinchonoideae*) for part 2 of Flora of Tropical East África: *Rubiaceae*. Kew Bulletin 36 (4): 817-859.

Bridson, D. M. 1994. Additional notes on Coffea (Rubiaceae) from Tropical East África. Kew Bulletin 49 (2): 331-342.

Bridson, D. M 1987. Nomenclatura notes on Psilanthus, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). Kew Bulletin LR (2) 453-460.

Bridson D. M. & Verdcourt, B. 1988. "Flora of Tropical East África – Rubiceae (Part 2). Polhill R. M. (eds), 727 pp.

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. & Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-321.

Carelli, M. L.; Lopes, C. R. & Mônaco, L. C. 1974. Chlorogenic acid content in species of *Coffea* and selections of *C. arabica*. Turrialba, 24: 398-401.

Carneiro, M. F. & Antão da Silva, C.M. 1999. Androgenesis in some catimor progenies. 18th International Conference on Coffee Science (Helsinki). Paris:ASIC, PA 741.

Carvalho, A. 1958. Advances in coffee production technology. Recent advances in our knowledge of coffee trees. 2 Genetics. Coffee and Tea Industries, New York, 81:30-36

Carvalho, A. 1960. Genética de *Coffea*. XXV. Ligação genética dos fatores anormais e anômala. Bragantia, Campinas, 19:CXCICXCV. (Nota 38).

Carvalho, A. & Fazuoli, L. C. 1993. Café. In: Furlani, A. M. C. & Viégas, G. A. eds. O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico, Campinas, Instituto Agronômico. Cap. 2, p. 29-76.

Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. & Mazzafera, P. 1986. Melhoramento do café laurina. In. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciências, 38, Curitiba. Anais. p. 908.

Carvalho, A. & Krug, C. A. 1949. Genética de *Coffea* XII. Hereditariedade da cor amarela da semente. Bragantia. Campinas, 9 :193-202.

Carvalho, A.; Medina Filho, H. P. & Fazuoli, L. C. 1984a. Evolução e melhoramento do cafeeiro. In: Aguiar-Parecin, M. L. R. ; Martins, P. S. ; Bandel, G. Eds. Tópicos de Citogenética e Evolução de Plantas. I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de

Plantas, Piracicaba, São Paulo. Revista Brasileira de Genética. p. 215-234.

Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C. & Costa, W. M. 1984b. Números de locos e ação de fatores para porte pequeno em *Coffea arabica*., Bragantia, Campinas, 43(2): 421-442.

Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C.; Guerreiro Filho, O. & Lima, M. M. A. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro (Genetic Aspects of the coffee tree). Revista Brasil. Genet., 14(1): 135-183.

Carvalho, A. & Mônaco, L. C. 1962. Natural cross pollination in *Coffea arabica*. Proc XVI Intern. Hort. Congr. Brussels 4 : 447-449.

Carvalho, A. & Mônaco, L. C. 1967. Genetic relaonships of selected *Coffea* species. Ciência e Cultura, 191):161-165.

Carvalho, A. & Mônaco, L. C. 1972. Transferência do fator Caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica*. Bragantia, Campinas, 31 (31): 379-399.

Carvalho, A.; Mônaco, L. C. & Van der Vossen, H. A. M. 1976. Café Icatu como fonte de resistência a *Colletotrichum coffeanum*. Bragantia, 35: 343-347.

Carvalho, A.; Tango, J. S. & Mônaco, L. C. 1965. Genetic control of caffeine content in coffee. Nature, 205: 314.

Carvalho, A.; Sondahl, M. R. & Sloman, C 1983. Teor de cafeína em seleções de café. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, MG., 10:111-113.

Charrier, A. 1978. La structure genetique des cafeiers spontanes de 1ª region Malgashe (Mascarocoffea). Leur relations avec les cafeiers d'origine africaine (Eucoffea). Memories ORSTOM, Paris, 97, 223 p.p.

Charrier, A. & Berthaud, J. 1975. Variation de la teneur en caffeine dans le genre *Coffea*. Café. Cacao, Thé 19 (4) : 251-264.

Charrier, A. & Berthaud, J. 1985. Botanical classification of coffee. In: Clifford, M. N. & Willson, K. C. Eds Coffee. Botany, Biochemistry and production of beans and beverage. Westport, connecticut. The Avi Publishing, Inc. p. 13-47.

Chevallier, A. 1947. Lés caféiers du globe. III. Systhematique des caféiers. Maladies et insects nuisibles. Encyclopedie biologique 28 : 1-256 Fascicule III, Paul Lechevalier, Paris.

Conagin, C. H. T. M. & Mendes, A. J. T. 1961. Pesquisas citológicas e genéticas de três espécies de *Coffea* – autoincompatibilidade em *C. canephora*. Bragantia, 20 : 787-804.

Cramer, P. J. S. 1957. A review of literature of coffee research in Indonésia. In: Wellman, F. ed. Muc. Publ. N.º 15. Turrialba, Inter. Am. First of Agric. Sci. P. 1-262.

Devreux, M. ; Vallaeys, G. ; Pochet, P. & Gilles, A. 1959. Researches sur l'autosterilite du caféier Robusta (*Coffea canephora Pierre*), Publ. INEAC 78, 44 p.p.

Fazuoli, L. C. 1981. Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M. incognita*. Colloque International sur protection des cultures tropicales, Lyon, France. p. 57.

Fazuoli, L. C. 1986. Genética e Melhoramento do Cafeeiro. In: Rena, A. B. ; Malavolta, E. ; Rocha, M. ; Yamada, Y. Editores. Cultura do Cafeeiro. Piracicaba. Potafos, p. 87-113.

Fazuoli, L. C. 1991. Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. Campinas, 322 p. (Tese de Dourtorado-Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP).

Fazuoli, L. C.; Costa, W. M.; Gonçalves, W. & Fernandes, J. A. R. 1983. Identificação de resistência em *Coffea canephora* e *C. congensis* ao nematóide *Meloidogyne incognita*, em condições de campo. Ciência e Cultura, São Paulo, 35 (7):20 (Suplemento).

Fazuoli, L. C.; Costa, W. M.; Gonçalves, M.; Lima, M. M. A. & Fernandes, J. A. R. 1984. Café Icatu como fonte de resistência e/ou tolerância ao nematóide *Meloidogyne incognita*, In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11, Londrina. Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, P. 247-248.

Fazuoli, L. C.; Medina, H. P.; Guerreiro Filho, O. , Lima, M. M. A. , Silvarolla, M. B. , Gallo, P. B. & Costa, W. M. 1996. Obatã (IAC 1669-20 e Tupi (IAC 1669-33), cultivares de café de porte baixo e resistentes a ferrugem.
Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 22º, Águas de Lindóia, SP, p. 149-150.

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª.edição. Embrapa. p.p. 220.

Guerreiro Filho, O.; Silvarolla, M. B. & Eskes, A. B. 1999. Expression and mode of inheritance of resistance to leaf miner. Euphytica, 105(1):7-15.

Harlan, J. R. & De Wet, J. M. J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon. 20 (4): 509-517.

Herman, E. & Haas, G. 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. HortScience 10, 588-589.

IAPAR. Café IAPAR 59 1993. Londrina, PR., IAPAR. Folder.

Krug, C. A. ; Carvalho, A. 1939. Genetical proof of the existence of *Coffea* endosperm. Nature, London, 144 : 515.

Krug, C. A. ; Carvalho, A. 1951. The genetics of *Coffea*. Advances in Genetics, New York, 4: 127-158.

Krug, C. A.; Carvalho, A. & Antunes Filho, H. 1959). Genética de *Coffea*. XXI. Hereditariedade dos caracteres de *Coffea arabica* L. var. laurina (Smeathman). DC. Bragantia, Campinas, 13: 247-255.

Ky, C-L.; Lovarn, J.; Akaffou, S.; Guyot, B.; Chrestin, H., Charrier, A.; Hamon, S. & Noirot, M. 1999. The use of genetic resources for coffee cup taste improvement. In International Seminar on Biotecnology in the coffee agroindustry, 3. Londrina, p. 28. (Resumos).

Lashermes, P.; Cros, J.; Combes, M.C.; Trouslot, P.; Anthony, F., Hamon, S. & Charrier, A. 1996a. Inheritance and restriction fragment lenght polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 93: 626 -632.

Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M.C. & Charrier, A. 1996b. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: 59 - 64.

Lashermes, P.; Agwanda, C.O.; Anthony, F.; Combes, M.C.; Trouslot, P. & Charrier, A. 1997a. Molecular marker-assisted selection: a powerful approach for coffee improvement. 17th International Conference on Coffee Science (Nairobi). Paris: ASIC, 474-480.

Lashermes, P.; Combes, M.C.; Trouslot, P. & Charrier, A. 1997b. Phylogenetic relationships of coffee- trees species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribossomal DNA. Theor. Appl. Genet. 94: 947 - 955.

Leroy, J. F. 1980. Evolution et taxogenese chez les caféiers. Hypothese sur leur origine. Comptes Rendus de 1ª Academie des Sciences, Paris, 291 : 593-596.

Leroy, J. F. 1982. L'Origine Kenyane du genre *Coffea* L. et la radiation des espécies à Madagascar. Colloque Scientifique International sur le Café, Salvador, Bahia, Brasil. 10:413-442.

Leroy, T.; Henry, A.M.; Philippe, R.; Royer, M.; Deshayes, A.; Frutos, R.; Duris, D.; Dufour, M.; Tesserreau, S.; Jourdan, I.; Bossard, G.; Lacombe, C. & Fenouillet, C. 1999. Genetically modified coffee trees for resistance to coffee leaf miner. Analysis of gene expression, insect resistance and agronomic value. 18th International Conference on Coffee Science (Helsinki). Paris:ASIC, B 209.

Longo, C. R. L. 1972. Estudo de pigmentos flavonóides e sua contribuição á filogênia do gênero *Coffea*. Piracicaba, 91 p. p. (Tese Doutorado-Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Brasil).

Maglio, C. A. F. P. 1983). Morfologia dos cromossomos nucleolares em fase de paquiteno no gênero *Coffea* L. Campinas, 92 p.p. (Tese de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP).

Mazzafera, P. 1991. Análises químicas em folhas de cafeeiros atacados por Atta spp. Revista de Agricultura, Piracicaba, 66(1):33-45.

Medina, D. M. 1972. Caracterização morfológica de híbridos interespecíficos de *Coffea*. Piracicaba, 111 p.p. (Tese de Doutorado – Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.

Medina Filho, H. P.; Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. 1982. *Coffea bengalensis* and . *C. travancorensis*: espécies diplóides, autoincompatível e autógamas de *Coffea*. Ciência e Cultura. Reunião Anual da SBPC, Campinas, São Paulo, 34: 713 (Resumo).

Medina Filho, H. P.; Carvalho, A.; Sondahl, M. R.; Fazuoli, L. C. & Costa, W. M. 1984. Coffee breeding related evolutionary aspects. In: Plant Breeding Reviews (J. Janick, ed.). Avi Publish. Co. Connecticut, USA V. 2 p. 157-193.

Mendes, A. J. T. 1958. Avances in Coffee Production Technology: Recent advances in our knowledge of coffee trees. 3 – Cytology, Coffee and Tea Industries 81: 37-41.

Moisyadi, S.; Neupane, K.R.; Stiles, J. I. 1999. Cloning and characterization of xanthosine-N7-methyltransferase, the first enzyme of the caffeine biosynthetic pathway. 18th International Conference on Coffee Science (Helsinki). Paris:ASIC, B 214.

Mônaco, L. C.; Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. 1974. Melhoramento do cafeeiro. Germoplasma do café Icatu e seu potencial no melhoramento. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 2, Poços de Caldas. Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA, p. 103.

Moraes, S. A.; Sugimori, M. H.; Thomaziello, F. M. & Carvalho, P. T. C. 1974. Resistência de cafeeiros a *Pseudomonas garcae*. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas

Cafeeiras, 2., Poços de Caldas – MG, 1974. Resumos...Rio de Janeiro, IBC, p. p. 183.

Neupane, K, R.; Moisyadi & Stiles, J. I. 1999. Cloning and characterization of fruit-expressed ACC synthase and ACC oxidase genes from coffee. 18 th International Conference on Coffee Science. (Helsinki) Paris : ASIC, B 213.

Orozco - Castillo, C.; Chalmers,K.J.; Waugh, R. & Powel, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 93: 934- 940.

Paillard, M.; Lashermes, P. & Pétiard, V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet. 87: 43 - 47.

Rafalsky, J.A. & Tingey, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding - RAPDs, microsattelites and machines. Trends Genet. 9: 275-280.

Rijo, L. 1974. Observações cariológicas no cafeeiro Híbridos de Timor. Portugaliae Acta Biologica, Lisboa, 13: 157-168

Sondahl, M. R.; Chapman, M. & Sharp, W. R. 1980. Protoplast liberation, cell wall reconstituition and callus proliferation in *Coffea arabica* callus tissues. Turrialba, 30 (2): 161-165.

Sondahl, M.R. & Lauritis, J.A. 1992.Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops. Biotechnolgy in agriculture 8: 401 -420.

Sondahl, M.R., Sondahl, C.N. & Gonçalves, W. 1999. Micropropagação do cafeeiro. I Encontro sobre Produção de Café com Qualidade. (Viçosa) Ed. Laércio Zambolin. 228 - 240.

Tanksley, S.D. & Orton, T.J. 1983. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Elsevier, Amsterdam, Part A, pp.516, Part B, pp.472.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. Nucleic Acid Res. 17: 6463-6471.

Teixeira, A. A.; Carvalho, A.; Fazuoli, L. C. & Mônaco, L. C. 1974. Avaliação da bebida de alguma espécies e híbridos interespecíficos de *Coffea*. Ciência e Cultura, 26(7) : 565.

Van Boxtel, J. 1994. Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and the biolistic method. Tese apresentada na Universidade de Wageningen. pp125.

Van Boxtel, J. & Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell Tissue & Organ Culture 44: 7-17.

Van de Graaf, N. A. 1981. Selection of Arabica coffee types resistant to coffee berry disease in Etiopia. Meded. Landbouwhogeschool. Wageningen, 81: 11.

Van der Vossen, H. A. M. & Walyaro, D. J. 1980 . Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. Euphytica, 29:777-791.

Van der Vossen, H. A. M. & Walyaro, D. J. 1981. The coffee breeding programme in Kenia: A review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. Kenya Coffee. 46(541)

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, Hornes, M.; Fritjers, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.

Weber, J.K. & May, P.E. 1989.Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44: 388-397.

Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Res. 18: 7213 - 7218.

Williams, J.G.K.; Kubelif, A.R.; Livak, K.J.; Rafalsky, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefulas genetic markers. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.

Wrigley, G. 1988 Coffee. (Tropical Agriculture series). Logman Scientific & Tecnical. USA. 612 p.

EL MEJORAMIENTO GENÉTICO EN AMÉRICA CENTRAL

Bertrand B.[1], Etienne H.[1] ,Santacreo R.[2], Anzueto F.[3], Anthony F.[4]

[1]Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y Modernización de la Caficultura en Centroamérica, República Dominicana y Jamaica. CIRAD/PROMECAFE/ICAFE/IICA, AP 55-2200, Coronado, Costa-Rica. fax:(506)2294689. IHCAFE, Edificio Banco Atlántico Centro, Tegucilgalpa HondurasANACAFE, Calle 0-50, Zona 14, Guatemala IRD/CATIE, CATIE, Turrialba, Costa Rica.
e-mail: benoit.bertrand@cirad.fr

1-INTRODUCCIÓN

Del siglo XVII hasta hoy, los objetivos de la selección del café Arábica en América Latina cambiaron para adaptarse a las exigencias de nuevas prácticas culturales y para combatir nuevas enfermedades. La xpansión mundial de *C. arabica*, basada en una diversidad genética reducida favoreció la expansión paralela de parásitos graves como son la Roya en Asia y América o la antracnosis del fruto ('CBD'), en progreso constante en Africa. Paralelamente, la monocultura y el abuso de pesticidas han incrementado los problemas causados por el parasitismo telúrico. Recientemente, la tendencia al aumento del consumo de café de alta calidad obliga a una selección más estricta hacia la calidad del producto.
Nuestro propósito es mostrar cuáles fueron las estrategias de selección empleadas en América Central, describir las principales variedades obtenidas y hasta donde el mejoramiento genético puede responder a los nuevos desafíos de la caficultura del siglo XXI.

2-EXPLOTACIÓN DE LA BASE GENÉTICA INTRODUCIDA EN EL SIGLO XVIII

A/ Los cultivares originales

Dos poblaciones de café de porte alto (o 'normal') se introdujeron, el Típica (o Arábigo común) y el Borbón, a partir de muy pocas semillas. La base genética y la variabilidad potencial eran por lo tanto muy reducidas.
En el sistema de cultivo que prevalecía hasta la mitad de este siglo, las diferencias de productividad entre un material seleccionado y un material poco seleccionado eran débiles, y casi desaparecían en ausencia de fertilizante. Como lo subraya Castillo (1990), "la necesidad básica del cultivo de café era un cambio en las prácticas culturales, no un cambio de variedad". A partir de los años 50, los productores empezaron progresivamente a adoptar la técnica de plena exposición solar con altos niveles de fertilizantes (Cowgill, 1958; Uribe, 1958). De ahí surgió el interés del cambio de material vegetal.
A partir de los años 1930, se habia iniciado un programa de selección en Brasil dentro de la población del Borbón (Mendes, 1939). En El Salvador también, se seleccionaron líneas de Borbón más productivas (Tekisic). Debido a la poca variabilidad de la población Típica (Castillo, 1984), y a su inferioridad productiva en comparación con las líneas seleccionadas del Borbón, se abandonó progresivamente la difusión de este material. Hoy esta variedad todavía se está cultivando en pocos sitios, en sistemas de bajo insumo y con sombra, y por parte de productores muy pequeños.
En cuanto a la variedad Borbón, su siembra se mantiene, en sistemas bajo sombra y a veces con un buen nivel de intensificación como es el caso en El Salvador o Guatemala por ejemplo.

B/ Las variedades mejoradas provenientes de la base tradicional (1950-1980)

Con el uso generalizado de la plena exposición solar en los años 60 y 70 en Colombia y Costa Rica, se evidenció que las densidades de siembra deberían ser aumentadas (Campos, 1998). En un sistema de alta densidad (más de 4000 plantas/ha), las variedades de porte pequeño como el Caturra son las más productivas (Cuadro 1).

Cuadro 1: Producción relativa (%) de tres variedades por tres densidades. Calculada sobre la base de la producción promedia de cinco cosechas en Costa Rica, en relación a la producción de la variedad H33, base 100. (adaptados de informes de labores del ICAFE, Costa Rica).

	Producción relativa en relación con la densidad (%)		
VARIEDADES	**3200 pl/há**	**4200 pl/ha**	**6300 pl/ha**
CATURRA	98..5	123	125
MUNDO NOVO	114..2	112	109
H33	100 (2660)*	100 (2620)*	100 (3000)*

* Producción observada en kg. de café oro/ha.

Según Castillo (1990), en Colombia, la variedad Caturra tuvo el importante papel de "catalizador" de nuevas prácticas culturales. Esta idea se aplica también en el caso de América Central en ciertas regiones favorables, en donde el cultivo de la variedad Caturra (o Pacas) asociado con una densidad de siembra elevada y una fertilización apropiada permitió alcanzar productividades muy elevadas. Sin embargo, en Guatemala, Nicaragua, Honduras y El Salvador, muchos productores no adoptaron los cultivares de porte pequeño ya sea porque pensaban que se iba a deteriorar la calidad del café o porque las condiciones edafoclimáticas o económicas requerían mantener mucha sombra, por lo que no se podía valorar las altas densidades.

La genealogía de los pricipales cultivares se resume en la figura 1. El Caturra es actualmente la variedad más sembrada en América Central. El Pacas, que es una variedad muy utilizada en El Salvador y en Guatemala, y el Villa Sarchi (llamada también la Luisa o Villalobos Borbón) que se sembraba en Costa Rica en los años 50-60 son genéticamente comparables al Caturra, pues todos derivan de la población del Borbón y tienen el mismo gen Caturra (Carvalho, 1991).

En América Central , las líneas de Mundo Novo introducidas producen igual que el Borbón y menos que el Caturra en sistemas de altas densidades (cuadro 1), por lo que se abandonó. Actualmente pocas áreas están sembradas con esta variedad . La variedad 1133, que fue cultivada en Costa Rica hasta los años 1980, proviene probablemente de un cruzamiento entre Típica y Borbón y como tal, es genéticamente cercana al Mundo Novo. Finalmente el Catuai da rendimientos similares o un poco superiores al Caturra. En Costa Rica, el Catuai produce alrededor de 8 a 15% más que el Caturra (informes del ICAFE, 1973-1989), y se recomendó su cultivo (Campos, 1987). Actualmente, es una variedad relativamente común en toda América Central pero su uso no ha introducido un cambio muy drástico en relación con el Caturra.

C/ Ventajas e inconvenientes de las variedades tradicionales

Con la selección y la posterior liberación del Catuai, se terminó la era de la explotación de la base genética introducida en América Central a partir del siglo XVIII. Con la excepción del Catuaí que resulta de un esfuerzo real por recombinar las características deseables de dos padres bien conocidos, todas las demás variedades resultan del mejoramiento de la población existente (Borbón), del mejoramiento de cruzamientos espontáneos (Mundo Novo), o bien de la selección a partir de una mutación (Caturra, Pacas) .

Con la excepción de la variedad Típica, las principales variedades descritas anteriormente se caracterizan por tener una alta productividad (González y Gutiérrez, 1978) y una buena adaptación a la luminosidad. En América Central, las variedades de porte alto (Borbón, Mundo Novo) se recomiendan para sistemas de cultivo bajo sombra regulada a densidades de 2000 a 3500 plantas/ha, mientras el Caturra o el Catuai se cultivan bajo sombra regulada o sin sombra con altas densidades de siembra (de 4000 a 7000 plantas/ha). Los defectos del grano para ambas variedades oscilan entre 5 a 12% para los caracoles, y 0 a 12 % para los frutos flotantes (fruto vano). El grano del Típica es más largo que el grano del Borbón y éste es un poco más grande que el grano del Caturra o del Catuai.

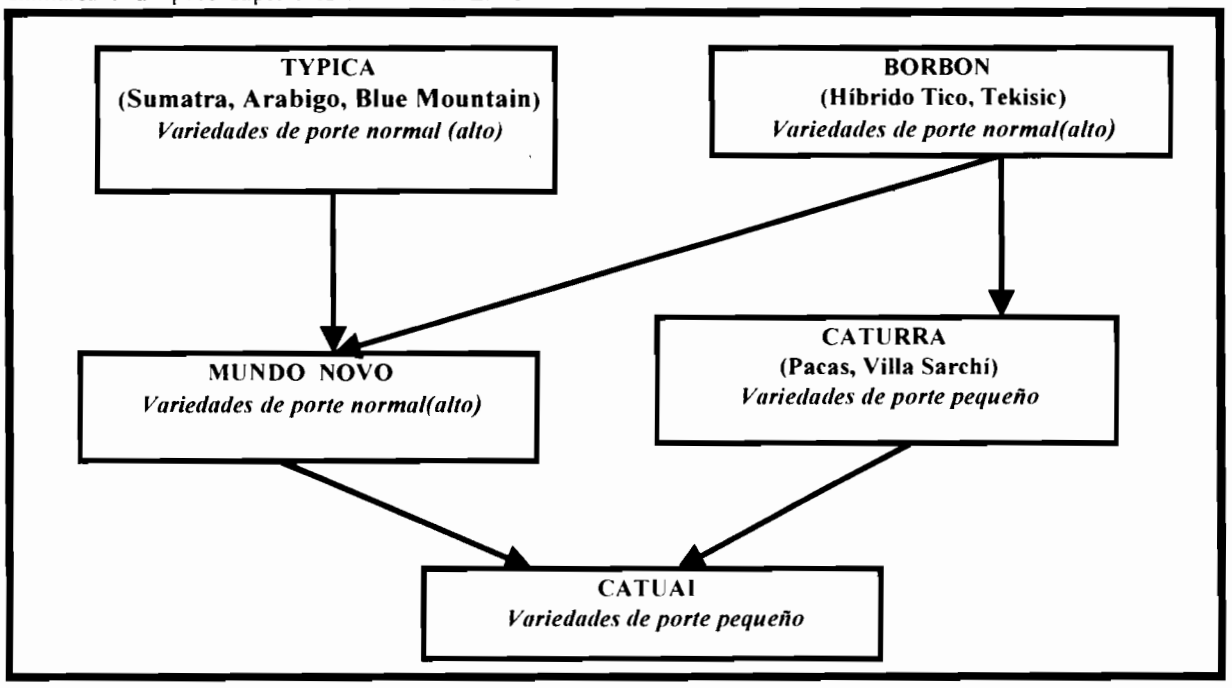


Fig 1: Genealogia de las principales variedades tradicionales
2 flechas indicam un cruzamiento.
1 flecha indica una mutación.

La calidad del café es muy discutida.
Aunque no se ha probado formalmente, muchos compradores de café indican que el Típica o el Borbón son superiores a todas las demás variedades en cuanto a la calidad en la taza y presentación física de los granos (Lingle, 1995). En realidad, estas variedades se cultivan casi exclusivamente bajo sombra y muchas veces se han hecho comparaciones con Caturra o Catuai cultivado sin sombra. Llama la atención el hecho que se considera Típica >Borbón ≥ Caturra ≥ Catuai para la calidad, cuando la clasificación para la productividad en América Central es exactamente inversa. Como lo subrayan Guyot *et al.* (1995), las observaciones sobre calidad deberían tomar en cuenta el estado fisiológico de la planta. En todo caso se considera que todas esas variedades tienen un alto nivel de calidad y corresponden a un estándar reconocido internacionalmente. Eso tiene como corolario que cualquier nueva variedad en América Central debe alcanzar ese estándar.
Debido a la base genética estrecha, la principal desventaja de las variedades tradicionales es su homogeneidad genética. Se traduce en particular por una ausencia de resistencia a las grandes enfermedades y plagas que afectan la caficultura mundial. Ninguna de estas variedades es resistente a la roya y todas son susceptibles a los nemátodos que afectan el café en la región y al CBD .

3-EXPLOTACIÓN DEL HÍBRIDO DE TIMOR

Debido al alto costo que representa el control químico de la roya y a la posible contaminación del medio ambiente que su uso conlleva, se contempló la posibilidad del uso de la resistencia genética para combatir esta enfermedad. Los principales logros se obtuvieron utilizando el Híbrido de Timor como progenitor. Después de varios años de selección genealógica (1972-1995) se obtuvieron diferentes variedades que están descritas brevemente a continuación. Además de tener varios genes de resistencia a la roya, el Híbrido de Timor presenta resistencia a otras enfermedades y plagas. A partir de 1989, se empezaron nuevas selecciones considerando la posibilidad de obtener variedades con resistencia simultánea a la roya, a los nemátodos y al CBD.

A/ Selección para la resistencia a la roya (1972-1995)

El objetivo de la selección es la obtención de una resistencia durable, es decir que permanezca efectiva por lapsos prolongados en grandes áreas de cultivo con ambiente favorable a la enfermedad (Jonhson, 1984). En América Central, se pretende introducir el número más grande posible de genes mayores (dominantes) en una variedad homocigota (línea pura). La durabilidad de esta resistencia se basa en la dificultad para el hongo de desarrollar simultáneamente genes de virulencia a varios *loci* (Eskes, 1989).

A partir de 1972, a través de diferentes intercambios con el CIFC, Brasil (IAC y UFV) y Colombia (CENICAFE), y luego a partir de 1978 a través de PROMECAFE 1, los países de América Central introdujeron varias descendencias de los tres orígenes de Híbrido de Timor: CIFC 832/1, CIFC 832/2, CIFC 1343 (fig.2).
Varias plantas que derivan del Híbrido de Timor son resistentes a todas las razas de roya conocidas por lo que se clasifican en un grupo fisiológico llamado grupo A. En América Central, para asegurar una resistencia durable, se decidió seleccionar únicamente plantas de este grupo.
Del material genético introducido en 1972 y luego a partir de 1978 se seleccionaron varias líneas (Echeverri y Fernández, 1989). Por lo general, en esta primera etapa los materiales derivados del CIFC832/1 fueron los más adaptados a las condiciones de América Central. Sin embargo, se notó una tendencia a un agotamiento prematuro de las plantas cuando las prácticas culturales o las condiciones climáticas no eran óptimas (Echeverri y Fernández, 1989).
Después de 12 años de selección genealógica, se liberó en Honduras la primera variedad Catimor con alta resistencia a la roya, el IHCAFE90 (Instituto del café de Honduras, 1991). En 1995, Costa Rica liberó otro Catimor, la variedad Costa Rica 95 (CR95). Recientemente se liberaron las variedades MIDA96 (en Panamá) y Lempira 98 en Honduras, las cuales son casi idénticas a la CR95.

B/ Descripción de las variedades 'Catimores' liberadas en América Central

La variedad IHCAFE90 (Catimor T5175)
En condiciones adecuadas la variedad produce alrededor de 30% más que el Caturra y 20% más que el Catuai en las condiciones de Honduras. En Costa Rica, con altas densidades, las diferencias productivas son respectivamente de 20 y 22% en promedio, (cuadros 2 y 3).

La variedad COSTA RICA 95: (MIDA96, Lempira 98)
Es una variedad que produce entre 25 y 35 % más que las variedades Caturra o Catuai según la zona (cuadro 3). Para mantener los altos rendimientos, requiere de una fuerte fertilización, si no se agota a partir del tercer año de producción. El grano es más grande (se acerca al Típica) y supera un poco el tamaño del T5175 y significativamente el tamaño del Caturra (respectivamente : 67.90% contra 65.17%, 63.30% y sobre un tamiz de 17/64 pulgadas). Su alta resistencia a la roya la hace recomendable principalmente para zonas donde existe una mayor incidencia de roya.
Es importante destacar aquí que tanto Costa Rica 95 como IHCAFE90 no presentan resistencia al CBD ni a los nemátodos (*Meloidogyne spp* y *Pratylenchus spp*). (Rodríguez, 1992; Anzueto, 1993; Bertrand *et al.*, 1995).

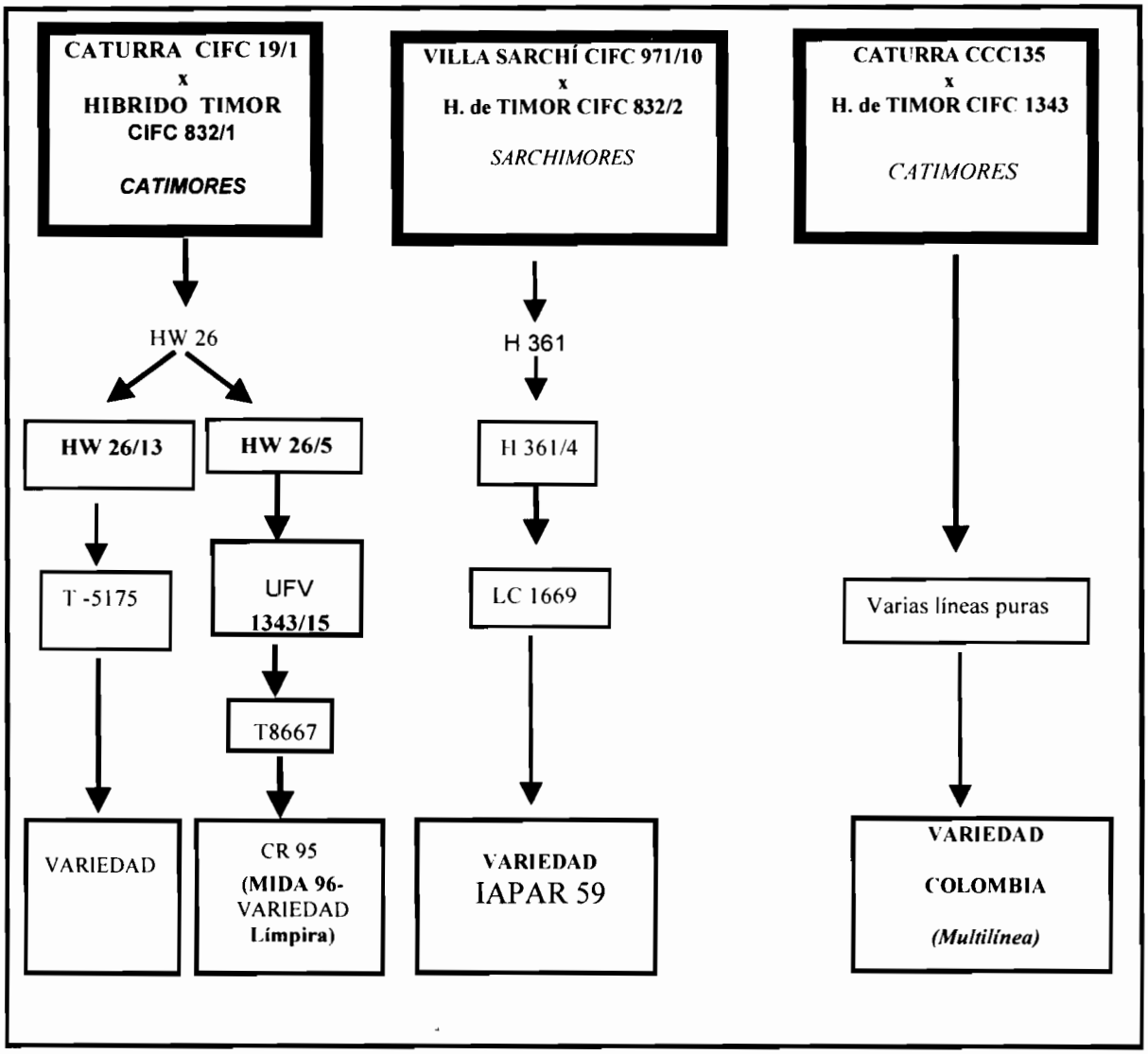


Figura 2 : Genealogía de las principales variedades derivadas del Híbrido de Timor

C/ La continuación de la selección de los derivados del Híbrido de Timor en América Central por la resistencia a la roya, el CBD, los nematodos (1989-200?)

Se eliminó una gran parte de todo el material genético resistente a la roya introducido por PROMECAFE, por no corresponder a los estándares de la región. Es así como la mayoría de los materiales provenientes de retrocruzamientos se ha eliminado (Cachimor, Cavimor, Mundomor). Sin embargo, algunos materiales provenientes de la variedad Colombia, de los Sarchimores o de selecciones de Brasil mostraron resistencia no solamente a la roya sino también a los nematodos y al CBD. Una nueva selección empezó en 1989 y continúa actualmente.

El Híbrido de Timor presenta cierta resistencia al CBD (Van der Vossen y Walyaro, 1980), por lo que ciertas descendencias pueden presentar resistencia. En estudios realizados en el CIRAD (Bertrand *et al.*, 1997a), se demostró que algunas líneas derivadas del CIFC 832/2 y del CIFC 1343 presentan resistencia contra varias cepas del hongo.

Se ha probado que el Híbrido de Timor presenta resistencia a ciertos nemátodos (Fazuoli y Lordello, 1978; Gonçalvez y Ferraz, 1978). Estudios realizados en América Central, demuestran que en el caso de *M. exigua* (el más común en Costa Rica, Nicaragua, Honduras), la resistencia es muy frecuente en los Catimores o Sarchimores o en los componentes de la variedad Colombia (Bertrand *et al.*, 1997a).

Cuadro 2: Producción media de seis cosechas par dos ensayos en kg. De café oro/ha. Los Linderos. IHCAFE. Honduras. (fuente :IHCAFE/Santacreo. 1996).

Material vegetal	Ensayo 1	Ensayo 2	% con relación al Catuai
IHCAFE90	6122	-	122.5
T8667	-	4577	140.7
CATUAI	5000	3253	100
CATURRA	4460	3162	-

Cuadro 3 : Producción promedio de 4 cosechas de 4 variedades en 9 localidades de Costa Rica: producción en kg. café oro/ha (fuente ICAFE/Aguilar. 1998).

Material vegetal	Producción	% relación con el Caturra
Costa Rica 95	3019 A	130
T5175 (IHCAFE90)	2810 A	121
Caturra	2326 B	100
Catuai	2288 B	98

Dos candidatos tienen que ser evaluados en los próximos años :

-El Sarchimor T5296 que proviene del cruzamiento entre Villa Sarchi 971/10 y CIFC 832/2. La generación F2 fue llamada LC 1669 por el IAC. Entró en América Central en generación F3. Se está seleccionando en Honduras. Ciertas líneas presentan uniformidad de porte (bajo). una productividad igual a la del Caturra y resistencia a *M. exigua.* Ciertas plantas fueron enviadas de Costa Rica al CIFC para ser probadas en cuanto a la resistencia al CBD. Varias plantas mostraron altos niveles de resistencia a ciertas cepas del hongo (Rodríguez. 1992).

- El Sarchimor IAPAR59. seleccionado por el IAPAR. Como la variedad Costa Rica 95. 94% de las plantas son del grupo A y 6% son resistentes a 29 razas de roya. Además esta variedad tiene una alta resistencia a M. exigua en Costa Rica (Bertrand et al. 1998b). Es susceptible al CBD (pruebas del CIRAD). Actualmente se evalúan en Costa Rica su productividad y su calidad.

D/ Ventajas y límites de los Catimores

Aunque faltan ciertas evaluaciones del material derivado del Híbrido de Timor. se llega casi al final de un proceso de selección que empezó en los años 70 en el caso de América Central y ya se pueden adelantar ciertas conclusiones.

Influencia del origen del Híbrido de Timor sobre las principales características agronómicas de los Catimores

Las variedades liberadas en América Central como en Colombia o en Brasil cumplen con los requisistos de sistemas altamente tecnificados. Todas son de porte bajo y se adaptan al cultivo a plena luz o con sombra regulada. En promedio. no se notaron diferencias entre los testigos y los derivados del Híbrido de Timor en lo que se refiere a frutos vanos y tamaño del grano. Los derivados del Híbrido de Timor tienden a producir un poco más de caracoles. Además. no se obtuvo diferencia significativa de productividad entre los Catimores. los Sarchimores y los derivados de la variedad Colombia (cuadro 4). pero si se obtuvieron diferencias significativas de ambos materiales en relación a los testigos.

¿Por qué producen más los derivados del HdT?

Aguilar *et al* (1997) sugieren que gran parte de la superioridad productiva de los derivados del Híbrido de Timor bien seleccionados proviene en primer lugar de la resistencia a la roya y en segundo lugar (en las condiciones del estudio). de la resistencia a los nemátodos *M. exigua.*

En Colombia. se reporta una superioridad productiva de más de 25% en promedio de la variedad Colombia en relación al Caturra. Esta superioridad estaría relacionada con la resistencia a la roya (Sierra Sanz. 1995: Moreno. com. pers.). En las dos mejores variedades CR95 y IHCAFE90 de América Central. también se puede formular la hipótesis de que además de la resistencia a la roya. la superioridad proviene de la fijación. por medio de la selección. de una parte del vigor híbrido o de características interesantes del Híbrido de Timor. Parece ser el caso de un mayor número de frutos por nudo (CR95) o de un mayor vigor vegetativo (IHCAFE90).

Expectativas: el problema de la calidad.

La selección ha llevado las nuevas variedades Catimor a un nivel productivo superior al estándar Caturra. Los factores genéticos que permitieron la 'revolución verde' de la caficultura de los años 1960 se mantuvieron (porte pequeño. adaptación a la luz plena o a la sombra manejada). La calidad de las dos variedades es un punto actualmente muy controversial. Dentro del termino calidad se debe distinguir varios conceptos. En primer lugar están las características físicas del grano (tamaño. forma. regularidad. densidad. presentación . color). Las diferencias entre diversas líneas de la variedad Colombia y el Caturra no

parecen ser consistentes según Castillo y Moreno, (1986) y Bertrand *et al.*, 1997a.

En segundo lugar viene la calidad organoléptica (taza). La introgresión de genes del Híbrido de Timor dentro del genotipo Caturra (o Villa-Sarchi) puede haber traído ciertos problemas de calidad en la taza. Según Moreno *et al.* (1995), no hay diferencias entre los Catimores que componen la variedad Colombia y el Borbón o el Típica.

Estudios recientes hechos en Costa Rica revelan una situación más contrastada en cuanto a los Catimores probados (fig. 3). En Costa Rica se realizó un estudio sobre la calidad de cuatro variedades : Caturra, Catuai, Costa Rica 95 y T5175 (Astúa y Aguilar, Informe anual ICAFE-1997) y éste estudio se repitió en 1999. La variedad T5175 se distinguió negativamente en cuanto al aroma, al cuerpo y a el ácidez. Además, tenía una sabor a medicina y mostró un tueste disparejo, falta de uniformidad en sus granos y fisura abierta, para los ocho sitios donde fue evaluada. Estas mismas calidades muy bajas se encontraron en otros materiales como por ejemplo: T16784 (Sarchimor), T17126 (linea de la var. Colombia).

Es difícil prever el ritmo de diseminación de los Catimores en América Central. En todos los países, se piensa limitar los Catimores a las plantaciones sembradas a menos de 1200 msnm. La alta productividad de Costa Rica 95 es un elemento muy atractivo para el productor, pero la renovación del cafetal con esta variedad dependerá también:

- del panorama de los precios en el mercado internacional,
- de la facilidad de obtención de semillas de buena calidad,
- de la aceptación por parte de los compradores de café de una calidad de café quizás inferior al estándar 'Caturra' .de la durabilidad de la resistencia a la roya.

4- LA SELECCIÓN EN EL MARCO DE UNA CAFICULTURA SOSTENIBLE

A/ Problemas por resolver y criterios de selección

El mercado mundial y las características de Centroamérica imponen limitantes a la caficultura que allí se practica. Las condiciones de relieve, la poca disponibilidad de nuevas tierras, y en ciertos casos la escasez de mano de obra, requieren de una intensificación del cultivo. Además el consumidor se vuelve más preocupado por la calidad y los grupos de presión conservasionistas exigen un café más ecológico. La intensificación aparece como una necesidad, pero debe ser una intensificación que proteja el medio ambiente y asegure la rentabilidad del cultivo aún en condiciones de precios bajos. La genética puede aportar soluciones a una parte de estos problemas. El conjunto de los riesgos biológicos (exógenos como endógenos), económicos y comerciales conduce a fijar los siguientes criterios de selección:

- resistencia a enfermedades y plagas (roya, CBD, nemátodos);
- productividad igual o superior a los mejores Catimores sin agotamiento precoz y con cierta estabilidad productiva;
- defectos del fruto comparables al estándar Caturra;
- tamaño superior al estándar;
- calidad en la taza igual o mejor que la del Caturra;
- porte pequeño y uniformidad de las plantas;
- buena adaptabilidad a condiciones limitantes.

Para responder a los criterios de selección mencionados, se necesita ampliar la base genética en América Central. Existen dos grandes vías para plantear nuevas alternativas de selección Charrier (1985).

La primera vía es la hibridación interespecífica con la introgresión de genes de resistencia de otras especies de *Coffea* en la especie *Coffea arabica* por medio de polinizaciones o por medio de la transferencia de genes a través de la ingeniería molecular (plantas transgénicas). Esta última es una tecnología nueva y su utilización para América Central requiere de una fuerte inversión.

La secunda vía es a través de la hibridación intraespecífica creando híbridos F1 con los cuales se espera tener un vigor vegetativo que se traducirá en una mejor producción y una mejor adaptabilidad del cultivo en ambientes difíciles. Es la vía escogida por PROMECAFE a partir de 1991 y el esquema se describe en la figura 4. Las mejores plantas (clones) son multiplicadas por embriogenesis somática

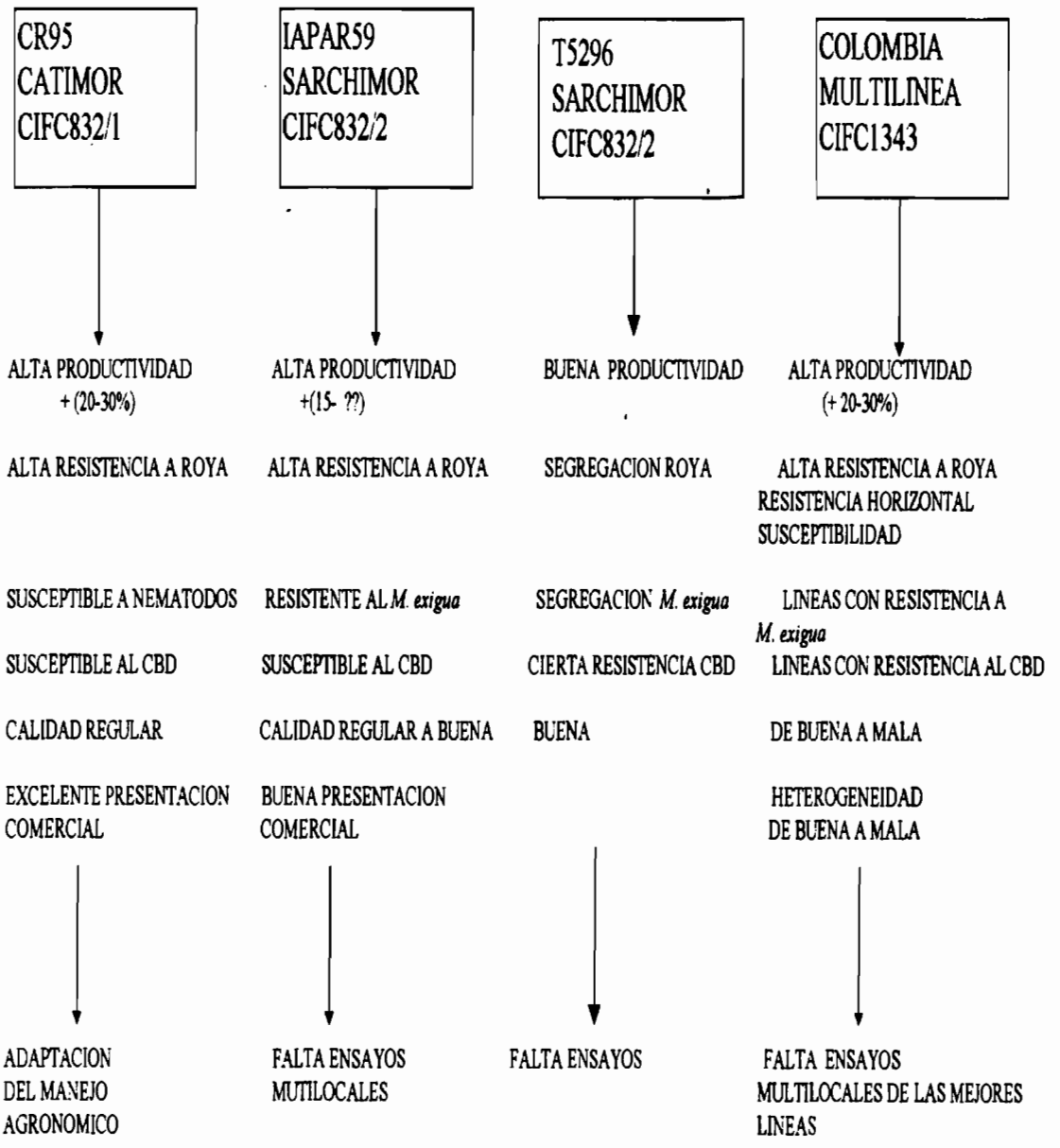


FIG 3 : PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LOS DERIVADOS DEL Hibrido de TIMOR DE INTERES PARA AMERICA CENTRAL.

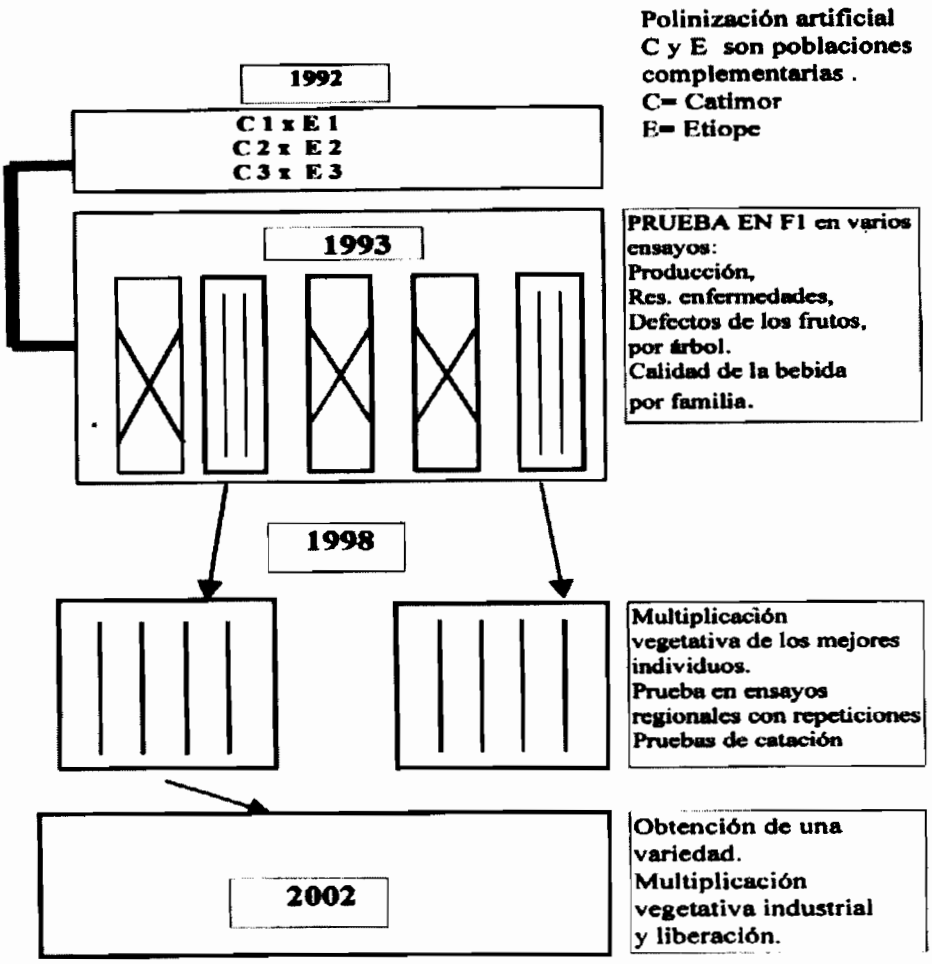


Fig. 4: ESQUEMA DE OBTENCIÓN DE CLONES DE HIBRIDOS F1

B/ Algunos resultados de los híbridos F1

Evidencia del vigor híbrido sobre la producción

En América Central, la heterosis promedio se establece en más de 30% cuando se comparó más de treinta combinaciones con el mejor padre (Bertrand *et al.*, 1997b). En el cuadro 5 se puede ver que la heterosis es más evidente para la producción, que es una característica global, que para las características simples como son el diámetro del tallo o la altura de la planta. Sin embargo, el vigor híbrido se manifiesta también con el aumento de la biomasa total (aunque en menor grado). Eso significa que el tamaño de la planta es generalmente mayor que él de la variedad línea, y que por consiguiente, tiende a ocupar más espacio. Por lo tanto, la superioridad productiva del híbrido puede ser en realidad menor de lo previsto cuando se siembra en condiciones de alta densidad.

Cuadro 4: Comparación de las orígenes del Híbrido de Timor con los testigos Caturra y Catuai, en dos ensayos, de la producción acumulada de 4 y 5 cosechas respectivamente, CICAFE, Heredia, Costa Rica. Producción en Kg. café oro/ha (Bertrand *et al.*, 1997a).

Ensayos	Origen	Nombre común	Número de líneas	Producción	% de producción con los testigos
Ensayo 1	CIFC 832/2	Sarchimor	7	16453 a	124
	CIFC 832/1	Catimor	5	15 485 a	117
	TESTIGOS		2	13 208 b	100
Ensayo 2	CIFC 1343	Colombia	16	15 006 a	123
	TESTIGOS		2	12 183 b	100

Cuadro 5: Promedio de una población de cuatro líneas (Caturra, Catuai, CR95, T5296) en comparación con una población de 17 híbridos F1 (Bertrand *et al, 1997b).*

Variables	Líneas	Híbridos	% de ganancia
Prod. Promedio, ***,kg. oro/ha	2 079	2 724	31
Peso granos secos (en gramo)	16.13	16.72	3.6
Diámetro al tallo*** (mm)	27.36	30.52	11.5
Altura*** (cm)	102	111.7	9.5
Número bandolas*	57.48	61	6.1
Longitud bandolas*** (en cm)	61.6	69	12
Longitud entrenudos*** (en m)	3.02	3.36	11.25
Número de frutos en 6 nudos*	96.9	101.7	4.95

*** estadísticamente diferentes P<0.001, P<0.01, P<0.05.

Recombinación de genes de resistencia a enfermedades

Una de las grandes ventajas de los F1 es que hay acumulación en un genotipo de las resistencias complementarias a las enfermedades y plagas como es el caso para los genes dominantes de resistencia a la roya, a los nemátodos y eventualmente al CBD que se encuentran ya sea dentro del grupo de los Catimores o dentro del grupo de los silvestres.

Defectos de frutos y calidad en la taza

De manera general, los F1 tienden a producir más caracoles (+ 5%) y frutos vanos (+ 6%) que las variedades líneas (Bertrand *et al.*, 1997b). En datos de experimentos en Kenia reportados por Van der Vossen (1985), los híbridos tienen sistemáticamente más caracoles que sus padres. Sin embargo la selección dentro de una familia de las mejores plantas para una multiplicación clonal debería permitir eliminar en gran parte este problema.

De las primeras pruebas de catación que se hicieron, se nota que la mayoría de los F1 igualan o superan el padre cultivado (CR95, T5296, Caturra, Catuai) (Datos sin publicar).

Selección de Veinte precandidatos

Una selección basada sobre los diferentes criterios sus-mencionados ha llevado a ofrecer veinte clones precandidatos que estan en curso de multiplicación mediante las técnicas de micropropagación. Estos clones producen entre 20 a 70% más que la variedad Caturra, con una calidad de la bebida igual o superior. Ciertos híbridos tienen resistencia a la roya y a diferentes nematodos. De 1999 a 2000, se preve sembrar más de 120 000 plantas directamente en las fincas de los productores Centroamericanos. Dependiendo del grado de aceptación por parte de los productores se seleccionaran los mejores candidatos que serán luego liberados como variedades. La idea es llegar a tener una oferta de varios clones.

Producción de variedades F1

El principal cuello de botella en el uso de los híbridos era la producción masiva de plantas. Hoy existe la posibilidad de utilizar el método de multiplicación vegetativa por medio de la embriogénesis somática. Los costos actuales de producción de una vitroplanta son de 0.10 USD es decir para el productor una planta de 8 meses que cuesta 0.40USD contra 0.30USD en América Central. El principal logro reside en la siembra directo del embrión (Barry-Etienne *et al*, 1999; Etienne *et al., in press*).

C/ Creación de variedades Porta-injerto: un nuevo concepto.

Para muchos frutales, la práctica del injerto es muy usual.Los patrones se utilizan ya sea como fuente de resistencia al parasitismo del suelo o a los virus, para reducir el vigor de las plantas (aumento de densidades de siembra) así como para aumentarlo, o bien para una mejor adaptación a condiciones particulares como exceso de calcio o de humedad, etc.

En café, la injertación (injertación hipocotilodonaria principalemente) se utiliza principalmente para luchar contra el parasitismo telúrico. En Guatemala se utiliza desde hace muchos años el patrón Robusta para controlar los nemátodos *Pratylenchus* sp. y *Meloidogyne* sp. En este país los nemátodos son muy agresivos y la práctica del injerto da resultados espectaculares en situaciones de fuertes infestaciones

con *Pratylenchus* , para el cual el patrón Robusta es altamente tolerante (Anzueto, 1993; Villain *et al.*, 1996). En condiciones de invernadero, Anzueto (1993) ha mostrado que las descendencias de Robusta utilizadas en Guatemala no presentan más de 30% de plantas resistentes. Esto indica la necesidad de realizar un trabajo de selección para obtener variedades con mayor resistencia a *Meloidogyne* spp manteniendo a la vez tolerancia a *Pratylenchus*.. A partir de 1990, se empezó una selección de nuevas variedades porta-injerto que se debería continuar hasta 2003.

La variedad Nemaya

La nueva variedad 'Nemaya' (Anzueto *et al.*, 1995; Bertrand *et al.*, 1995), obtenida en 1995, viene del cruzamiento de dos árboles de la colección del CATIE, el T3561 (planta 2-1) y el T3751 (planta 1-2). La descendencia de este cruzamiento es altamente resistente a *Meloidogyne* sp. del Salvador (Peña, 1994), de *M. incognita* de Guatemala (Anzueto, 1993), de *M. exigua* de Costa Rica (Bertrand *et al.*, 1998a) y de *M. arabicida* de Costa Rica .

En relación con los nemátodos de Guatemala y El Salvador que son particularmente agresivos, los Robustas no seleccionados presentan alrededor de 35% de plantas resistentes cuando la variedad Nemaya presenta cerca de 80% de plantas resistentes. En relación a *M. exigua* y *M. arabicida*, la variedad Nemaya presenta respectivamente 90% y 80% de plantas resistentes. Además cabe notar que el T3751 (planta 1-2) - uno de los dos padres de la variedad- ha demostrado ser más tolerante a *Pratylenchus* sp. que otros Robustas (Anzueto, 1993). Complementariamente los Robustas presentan un buen nivel de tolerancia a las cochinillas *Dysmicoccus cryptus,* netamente superior a la tolerancia de los Arábicas (Garcia,1992). La multiplicación de la variedad Nemaya se está realizando en los países miembros de PROMECAFE por medio de la embriogenesis somática.

Cabe notar que se debería hacer más investigaciones en cuanto a la práctica del injerto en condiciones de bajura (<. 800 msnm). En efecto a esas alturas limitantes para el Arabica, el Robusta confiere un aumento de vigor, tanto en presencia de nemátodos como en su ausencia y podría procurar una mejor adaptabilidad en suelos ácidos

Los Catimores

En situaciones de altura (800-1000 metros), las bajas temperaturas empiezan a causar ciertos disturbios fisiológicos a los Robusta. A más de 1000 msnm, Bertrand *et al.*, (1998a) estiman que en situación de muy baja infestación con nemátodos, la injertación causa una pérdida de 10 a 20% de la producción en relación a testigos no injertados. Eso significa que en presencia de un nemátodo como *M. exigua,* que no causa pérdidas superiores a un 10-20% en condiciones de clima favorable, el injerto sobre patrón de Robusta no se justifica. En este caso particular, la resistencia encontrada en los Catimores (variedad IAPAR59 por ejemplo), puede ser aprovechada. Un patrón Catimor de igual crecimiento al Caturra no debería afectar el crecimiento de la planta. Sin embargo, en situaciones de ataques múltiples de *Pratylenchus* y *M. exigua*, esta solución no es recomendable, pues debido a la susceptibilidad del Arábica al *Pratylenchus* y a la competencia entre ambas especies se nota un fuerte incremento de la población de *Pratylenchus* (Bertrand *et al.*, 1998b)

Hacia la creacción de una variedad porta-injerto Arabusta

El híbrido interespecífico Arabusta, creado a partir de uno de los padres de la variedad Nemaya cruzado con un silvestre resistente a *M. incognita* y *M. arabicida*, podría ser una valiosa fuente de resistencia heredada del Robusta y, a la vez, conferir un fuerte vigor al injerto en condiciones de más de 800 msnm en donde el Robusta sufre por las bajas temperaturas. En el CATIE se esta realizando un programa de duplicación del número de cromosomas del T3751 (1-2) y del T3561 (2-1), para crear dos tetraploides que luego se podrán cruzar con uno o varios Arábica silvestre resistente a ciertos nemátodos creando así diferentes variedades de Arabusta.

5-CONCLUSIÓN

La ampliación de la base genética es el mayor objetivo de los programas de mejoramiento genético de América Central. A corto y mediano plazo, los trabajos de selección permitiran una oferta de otras variedades Catimores y de varios clones F1 con resistencia a la roya, e/o a los nemátodos y al CBD y todos de buena a muy buena calidad. En las regiones en donde los nemátodos son muy agresivos y en situaciones de bajura, la variedad porta-injerto Nemaya será una buena solución agronómica. Para las situaciones de altura en donde el Robusta tiene problemas de crecimiento, se puede esperar la oferta dentro de 5-6 años de un porta-injerto de tipo 'Arabusta' con alta resistencia a los nemátodos y de gran vigor.

La meta es llegar al productor con una oferta de diferentes variedades y patrones las cuales el escogerá según sus necesidades ecológicas y económicas y sus prioridades de comercialización.

La diversidad genética presente en América Central está en proceso de evaluación por los marcadores moleculares RAPD, AFLP (Anthony *et al., in press;* Lashermes *et al, in press).* El material estudiado constituye un amplio muestreo de la totalidad del área de origen de la especie *C. Arabica* (individuos silvestres de las recolecciones FAO y ORSTOM en Etiopía y de la prospección IPGRI en Yemen), así como por las principales variedades (Típica, Borbón, Caturra, Villasarchi, derivados del Híbrido de Timor). Los primeros resultados corroboran la existencia de una base genética limitada en *C. arabica*, revelada por

los estudios preliminares de Orozco-Castillo *et al.* (1994) y de Lashermes *et al.* (1996c). Esta evaluación genotípica se completa con la evaluación fenotípica, basada en la observación en el campo de los caracteres utilizados como criterio de selección en la región, por ejemplo los defectos de los frutos y de los granos, o la resistencia a enfermedades y parásitos (roya, nematodos, CBD). Los resultados tendrán fuertes implicaciones en la conservación y la utilización de los recursos genéticos. Revelar la estructura de la diversidad disponible en América Central para el mejoramiento regional conduce a la definición de grupos de individuos genéticamente cercanos. La diversidad disponible podrá entonces ser utilizada de manera racional basándose en la estimación de la distancia genética entre las variedades cultivadas y los diversos grupos de individuos silvestres, cultivados o introgresados.

En América Central, los híbridos F1 creados entre los individuos silvestres y las variedades Catimor o Sarchimor permiten crear poblaciones segregantes para numerosos caracteres agronómicos, con determinismo monogénico. En 1998 se inició un proyecto financiado por la UE para identificar marcadores moleculares ligados a la resistencia a dos especies de nematodos, *M. exigua* de Costa Rica y *Meloidogyne* sp. de Guatemala. Otros caracteres monogénicos de interés podrán también ser marcados a corto plazo. Por ejemplo, la explotación de la esterilidad masculina, detectada en varios individuos etíopes de la colección del CATIE (Dufour *et al.*, 1997), abriría la puerta a una distribución de híbridos F1 por semilla.

6-AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la dirección del ICAFE de Costa Rica por su apoyo al programa regional de fitomejoramiento de PROMECAFE

7-LITERATURA CITADA

Aguilar, G. 1995. Variedad Costa Rica 95. Instituto del Café de Costa Rica, Convenio ICAFE-MAG, 30 p. ISBN 977-55-014-X.

Aguilar, G, Bertrand B. y F. Anthony. 1997. Comportamiento agronómico y resistencia a las principales plagas de diferentes variedades derivadas del Híbrido de Timor. Noticiero del café. Revista del Instituto del café de Costa Rica. N° 94-95. ISSN 108-421X, 8p.

Anzueto, F. 1993. Etude de la résistance du caféier à *Meloidogyne sp.* et *Pratylenchus sp. In* Thèse de Docteur Ingénieur, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes , 17 mars 1993, 123 p.

Anzueto, F, Bertrand B. y M. Dufour , 1995. Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nemátodos de América Central. Boletín PROMECAFE, Enero-Junio, IICA, ap 1815, Guatemala, 13-15.

Bertrand B., Anzueto F, Peña M, Anthony F. y A.B. Eskes. 1995. Genetic improvment of coffee for the resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne sp. In* América Central. In 15 congreso internacional sobre el café, Kyoto, mayo de 1995 , Japón, ASIC (Paris): 630-636.

Bertrand, B., Aguilar G, Bompard E, Rafinon A, and F. Anthony, 1997a. Comportement agronomique et résistance aux principaux déprédateurs des lignées de Sarchimors et Catimors au Costa Rica. Plantations Recherche Développement. 4 (4): 312-321.

Bertrand, B,,Aguilar G, Santacreo R, Anthony F., Etienne H., Eskes A.B., and A. Charrier. 1997b. Comportement d'hybrides F1 de *Coffea arabica* pour la vigueur, la production et la fertilité en Amérique Centrale. In 17 congreso internacional sobre el café, Nairobi, julio de 1997 , Kenya, ASIC (Vevey, Suiza).

Bertrand, B., Borbón, O., and G. Aguilar. 1998a. Situación nematológica en un cafetal de la meseta Central de Costa Rica y posibilidades de control. *In:* ICAFE, San José, Costa Rica (Eds). Memoria III seminario resultados y avances de investigación. p 15-28.

Bertrand, B., Cilas, C., Hervé, G., Anthony, F., Etienne, H., and L. Villain. 1998b. Relations entre les populations des nématodes *Meloidogyne exigua* et *Pratylenchus* sp., dans les racines de *Coffea arabica* au Costa Rica. Plantations Rech Dev 5:4, 281-286.

Campos, E. 1987. Comparación del Catuai con el Caturra. Noticiero del café, Año 2, N°27, Dec 1987, ICAFE, San José, Costa Rica, 3 p., ISSN 0550-1105.

Campos, M. E. 1998. Densidades de siembra y distancias entre plantas e hileras. *In:* ICAFE, San José, Costa Rica (Eds). Memoria III seminario resultados y avances de investigación. pp 95-100.

Carvalho, A., Medina Filho H.P, Fazuoli L.C, and O. Guerreiro Filho. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro. Rev. Brasil. Genet. 14: 1, 135-183.

Castillo Zapata, J., 1990. Mejoramiento genético del café en Colombia. *In:* 50 años de CENICAFE 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Chinchiná (Colombia), CENICAFE, p. 46-53. CDD -633.730968.

Castillo Zapata, J., and J. Leguizamon Caycedo. 1992. Virulencia de "Hemileia vastatrix" determinada por medio de plantas diferenciales de café en Colombia. Cenicafé (Colombia). 43 (4): 114-124.

Castillo Zapatta, J., and G. Moreno. 1986. La variedad Colombia: Selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto, Federación Nacional de cafeteros de Colombia, Bogotá, 172 p.

Castillo Zapata, J., 1984. Actividades de Colombia en investigación en mejoramiento genético del café. *In :* IV reunión regional de especialistas en mejoramiento genético del café. Antigua, Guatemala 1-5 Octubre de 1984, PROMECAFE-IICA, 30 pp.

Charrier, A. 1985. Progrès et perspectives de l'amélioration génétique des caféiers. *In:* 11° Coloquio científico internacional sobre el café, Lomé. Vevey, Suiza, ASIC, p 403-425.

Cowgill, W.H. 1958. The Sun-hedge system of coffee growing. Coffee and Tea Industries. Advances in Coffee Production. 81 (11): 87-90.

Dufour, M., Anthony, F., Bertrand, B. and A.B. Eskes. 1997. Identification de caféiers mâle-stériles de *Coffea arabica* au CATIE, Costa Rica. Plantations, Recherche, Développement 4 (6): 401-407

Echeverri, J.H. and Fernández C.E., 1989. The PROMECAFE program for Central América. *In* Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and management. Eds Kussalappa A.C., Eskes A.B., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p 337. ISBN 0-8493-6899-5.

Etienne, H., Bertrand, B., Anthony, F., Cote, F., and M.Berthouly. 1997. L'embryogenèse somatique, un outil pour l'amélioration génétique du café. *In:* ASIC (ed.) 17 th Int Sci Colloquium Coffee. ASIC, Vevey, Switszerland, pp 457-465.

Etienne-Barry, D., Bertrand, B., Vasquez, N., and H.Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell reports 18:77.

Eskes, A.B. 1989. Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and management. Eds Kussalappa A.C., Eskes A.B., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p 337. ISBN 0-8493-6899-5.

Fazuoli, L.C. 1985. Génetica e melhoramento do cafeeiro. *in* Cultura do cafeeiro, Piracicaba, Brasil. Associaçiao Brasileira para pesquisa da potasa e do fosfato. 87-113p.

Fazuoli, L.C. and R.R.A. Lordello. 1978 . Resistência de cafeeiros Híbrido do Timor a *Meloidogyne exigua*. Ciencia y Cultura, Suplemento, Brasil, 30.3.

Garcia, A. 1992. Les pseudococcidae déprédateurs des racines du caféier (*Coffea arabica* L.) au Guatemala. Cas particulier de Dysmicoccus cryptus (Hempel, 1918). Thèse doct. Univ. Paul Sabatier Toulouse III, 122 p.

Gonçalvez, W., and L.C.C.B. Ferraz. 1978. Resistência do cafeeiro a nematóides: II - Testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. Nemat. brasileira, vol. XI, 125-142.

González, G., and Z. Gutiérrez. 1978. Respuesta de algunos cultivares de *Coffea arabica* a diferentes densidades de siembra. Agron. Costarr. 2(1): 61-68.

Guyot, B., Gueule, D., Manez, J.C., Perriot, J.J., Giron, J., and L. Villain. 1995. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabicas. Plantation recherche développement, 3 (4):272-280.

Instituto Hondureño del café, 1991. Una nueva variedad de café con resistencia genética a la roya. Boletín de PROMECAFE, n°52-53, Junio-Dic., 15-18.

Informes anuales de labores, 1973 a 1989 . Departamento de Investigaciones y transferencia de tecnología, Instituto del Café. San José. Costa Rica.

Jonhson, R. 1984. A critical analisis of durable resistance. Anual Review of phytopathology. (EE.UU). 22. 309-330.

Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M.C.and A. Charrier. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: 59-64

Lingle, T. 1995. Desarrollo del café de especialidades "Gourmet", orgánico y otros. Doc. Nestlé, XVII Simposio de caficultura, 23-27 Octubre. San Salvador, El Salvador, PROMECAFE, PROCAFE. Actas por aparecer

Mendes, J.E.T.1939. Ensaio de variedades de cafeeiros. Bol. Instituto agronomico do estado em Campinas, Sao Paulo . Tec. (65) 35 p.

Moreno Ruiz, G., Moreno E., and G. Cadena.1995. Bean characteristics and cup quality of the Colombia variety *(Coffea arabica)* as judged by international tasting panels. *In:* 16° Coloquio científico internacional sobre el café, Kyoto ASIC, 16° Colloque, Kyoto. Vevey, Suiza, ASIC. Acts, p. 574-583.

Orozco-Castillo, C., Chalmers, K.J., Waugh R., and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87: 934-940

Peña, M.X. 1994. Evaluación fenotípica y genética para la resistencia al nemátodo *Meloidogyne incognita* en Híbridos de *Coffea canephora*. Tesis de Master. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 78p.

Rodríguez, C.J. 1992. Pathology & Improvment of coffee for the main deseases. Contract TS2 0259-P de la CEE. *In* Fifth scientific report, 1st May- 31 octuber 1992 .

Sierra Sanz, C.A. 1995. Control de la roya del cafeto con base en niveles de infección y su efecto en la producción. CENICAFE, Chinchina, Colombia, Vol. 46, 2, 11 p.

Uribe, A. 1958. El cultivo del café al sol en Colombia. Revista cafetalera de Colombia. 134: 31-34.

Villain, L., Sarah J.L., Decazy B., Molina A., and S.Sierra. 1996. Evaluation of grafting on

Coffea canephora var. Robusta and chemicals treatment for control of Pratylenchus sp. en C. arabica cropping systems. Third International nematology congress, abstracts of posters, p.155.

Van der Vossen, A.M. 1985. Coffee selection and breeding , *In* Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. Clifford, (M.N.) & Wilson (K.C.)., Ed., AVI, Westport, CT, 1985, Chap. 3.

Van der Vossen, H.A.M., and D.J.Walyaro. 1980. Breeding for resistance to coffee berry desease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. Euphytica 29: 777-791.

FAPEAGRO
NASCIDA DA NECESSIDADE EM COMUM
DE DIVERSOS SETORES EM PROL
DA VIABILIDADE E DESBUROCRATIZAÇÃO
O ENCONTRO DA PRODUÇÃO COM A TECNOLOGIA
MARCANDO UM NOVO TEMPO NO DESENVOLVIMENTO DO AGRONEGÓCIO
A Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio FAPEAGRO, desenvolve um trabalho de compatibilização de demandas tecnológicas e recursos necessários ao seu atendimento. A FAPEAGRO também executa projetos, identificando e mobilizando recursos técnicos disponíveis em órgãos de pesquisa ou contratando diretamente profissionais no mercado, além de desenvolver atividades de prospecção tecnológica, gerenciamento e administração de recursos humanos e financeiros, no âmbito do Agronegócio.
FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO DO AGRONEGÓCIO
Utilidade Pública Municipal Lei nº 7.250 03.12.1997 - Utilidade Pública Estadual Lei nº 12305 - 19.08.1998
CNPJ 01.561.218/0001- 88
Rua Maranhão, 314 - 8º andar sala 82 - Cep: 86010-904
Fone/fax: 0xx(43)334-1601- Londrina -PR
http://www.fapeagro.org.br - e-mail: fapeagro@sercomtel.com.br

BIOTECHNOLOGY FOR GENETIC IMPROVEMENT OF INDIAN COFFEE

H.L. Sreenath

Centre, Unit of Central Coffee Research Institute Coffee Board, Manasagangothri, Mysore - 570 006, Karnataka, India e-mail: tisscult@giasbg01.vsnl.net.in

SUMMARY

For India, a developing country, coffee earns around 450 million dollars in foreign exchange which is very important for the economy. Due to sustained research efforts of Central Coffee Research Institute (CCRI), the production and productivity of Indian coffee has improved steadily during the last five decades. However, further intense research efforts are needed to make the Indian coffee industry more vibrant to face the challenges of the next millenium. Biotechnology is identified as a thrust area for meeting these challenges. In India, research efforts on coffee biotechnology are focussed on micropropagation, anther culture, embryo rescue, endosperm culture, protoplast culture, genetic transformation, marker aided selection and in-vitro preservation. Research efforts at CCRI have resulted in successful plant regeneration through somatic embryogenesis in more than 20 selections of C. arabica (arabica) and C. canephora (robusta). Hardening procedure has been evolved for micropropagated plants. Large scale field trials of micropropagated plants is taken up using the 3 selections viz., Cauvery, Sln.9 and CxR and trial plots of tissue cultured plants are established in different agroclimatic zones. Plant regeneration is achieved from the apical bud and nodal explants, but further refinement of this technique is required for commercialization. For the first time in any plant species, plant regeneration is achieved from integument tissues in the CxR cultivar. Protocols have been optimized for direct and indirect plant regeneration from embryo culture. Plants derived from embryo culture of interspecific crosses between cultivated C. canephora (robusta) and 3 indigenous wild species, viz., C. bengalensis, C. travancorensis and C. wightiana have been established in the field. Plant regeneration is achieved for the first time from the anther culture in the diploid CxR cultivar of coffee. Plant regeneration is achieved from endosperm cultures of C. arabica (S. 2803) which is again a first achievement for any coffee species. Zygotic embryos of C. arabica have been preserved for 2 years under slow growth conditions and successful cryopreservation of zygotic embryos is achieved in two species. Protocols have been developed for protoplast isolation from embryogenic calli in two species. Initial success is achieved in developing DNA markers and genetic transformation. These programmes are aimed at developing molecular markers linked to leaf rust resistance, engineering leaf rust resistance with antifungal genes, isolation of genes for leaf rust resistance, using Bt genes to combat major pests and isolating caffeine degradation genes for manipulation of caffeine content in the beans.

INTRODUCTION

The genus *Coffea* coming under the family Rubiaceae is described to contain about 70 species. However, only two species are commercially important. *C. arabica* popularly known as arabica coffee accounts for about 70% of the coffee consumed in the world because of its superior beverage quality. *C. canephora* supplies the remaining 30%. Cultivated varieties of this species are generally called robusta coffee. A few other species of coffee like *C. dewevrei, C. liberica and C. racemosa* are consumed in the local producing areas.

Coffee is the most important agricultural export commodity in the world and many countries are involved in its production, trade and consumption. It generates 15 billion US dollars per year in the green coffee trade. The average world production is estimated to be 93 million bags (60 kgs each) (about 56 lakh tonnes) from more than 50 coffee producing countries in the tropical regions of Latin America, Africa and Asia. For most of these countries, coffee is the major source of hard

currency earnings. India is among the top ten coffee producing and exporting countries along with Brazil, Columbia, Indonesia, Vietnam, Mexico, Ivory Coast, Ethiopia, Uganda and Guatemala. In India both arabica and robusta coffee are cultivated almost in equal areas. Coffee production in India has reached 2.3 lakh tonnes in 1998 from around 19 thousand tonnes in 1950, while the average productivity has increased to over 850 kg/ha from 204 kg/ha during the same period.

Major challenges to coffee cultivation in India

Managing the existing biodiversity, tackling major biotic and abiotic stresses, quality improvement and protection of environment are the major challenges to be addressed to make coffee cultivation more sustainable.

The most important disease affecting Indian coffee is the leaf rust caused by the fungus *Hemileia*

vastatrix. The disease first recorded from India in 1869, has developed into the most challenging disease of arabica coffee in India. The major pests attacking Indian coffee are, the coffee berry borer *(Hypothenemus hampei)*, white stem borer *(Xylotrechus quadripes)*, mealy bugs *(Planococcus citri* and *P. lilacinus)*, shot hole borer *(Xylosandrus compactus)* and root nematode *(Pratylenchus coffeae)* (Anonymous, 1998). Water stress and oxidative stress are the most important abiotic stresses affecting the coffee plants and responsible for severe yield losses. With the expansion of coffee into non-traditional areas, high temperature stress also needs attention. Apart from the biotic and abiotic stresses, increasing stringency of environmental protection is gaining prominence.

Coffee improvement by conventional breeding

Employing conventional plant breeding methods of individual plant selection followed by progeny evaluation, hybridization and pedigree selection, coffee plants with high yield and vigorous plant growth have been developed. In addition to these, back cross methods have been used to transfer specific traits such as, short internodes, and disease and pest resistance to *C. arabica* from other cultivars or related species. During the last 60 years, Central Coffee Research Institute (CCRI), India, has developed 12 improved cultivars of arabica and 3 improved cultivars of robusta, through conventional breeding (Anonymous, 1996). A few more promising selections are in the advanced stages of evaluation. However, inspite of tremendous contribution to coffee genetic improvement, conventional breeding suffers from the limitations like, the genetic barrier of chromosome number (diploids vs. tetraploids), autoincompatible alleles (diploid species), lack of genetic understanding and long breeding cycles. As a result of these factors, the transfer of genetic traits from wild outbred species of the genus to the cultivated species is quite difficult.

Biotechnology for coffee improvement

Biotechnology can supplement the efforts of coffee breeders with additional tools which can overcome the limitations of traditional plant breeding to a great extent. There is tremendous scope for application of crop biotechnology tools for genetic improvement of Indian coffee. Coffee improvement through biotechnology can focus on three different areas of applications: agronomy, processing industry and consumers. Agronomic benefits should focus on reducing direct and indirect farming costs. To reduce coffee farming costs, the new technologies can address fertilizer efficiency, disease and pest resistance and crop management aspects that will reduce labour utilization (herbicide tolerance, mechanized harvesting etc.).

Various biotechnology approaches like micropropagation, embryo rescue, anther culture, cell line selection, somaclonal variation, protoplast culture, *in-vitro* preservation, marker aided selection and genetic transformation have tremendous potential for genetic improvement of coffee. Eversince the first report on tissue culture regeneration of coffee by Staritsky (1970), there has been a steady progress in coffee biotechnology research (Sreenath & Naidu, 1997; Sondahl & Lauritis, 1992; Sondahl & Loh, 1988).

COFFEE BIOTECHNOLOGY RESEARCH AT CCRI

Biotechnology research is conducted at CCRI with the short term and long term objectives of micropropagation and genetic improvement respectively. For achieving the short term and long term objectives, research efforts are focussed on stem, leaf, integument, apical bud and node cultures for micropropagation, anther culture, embryo culture, endosperm culture, protoplast culture, genetic transformation and molecular markers for genetic improvement and *in-vitro* preservation techniques, including cryopreservation, for conserving the biodiversity. Significant achievements made in these areas of research are summarized here.

Micropropagation

In coffee, micropropagation is possible by micro-cutting production and somatic embryogenesis. Various experiments conducted to develop micropropagation protocols for Indian cultivars of coffee has resulted in plant regeneration through somatic embryogenesis from stem and leaf tissues in more than 20 genotypes/clones of arabica, robusta and hybrid selections (Raghuramulu *et al.*, 1987; Babu *et al.*,1993; Jayashree *et al.*, 1995; Muniswamy & Sreenath, 1995b; Sreenath, 1998b). Genotypic differences were found in respect to callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in arabica coffee (Naidu et al. 1999). Encapsulation techniques were standardized (Muniswamy & Sreenath, 1995a). Hardening protocols are developed for small scale (Muniswamy *et al.*, 1994) and medium scale plant production and trial plots of tissue cultured plants are being established in different agroclimatic zones (Sreenath, 1998b). Three improved selections viz., Cauvery, Sln.9 and CxR are being

used for large scale field evaluation of micropropagated plants against seedling progeny. Plant regeneration is achieved from the apical bud and nodal explants (Ganesh & Sreenath, 1997), but further refinement of the technology is required. Effect of TIBA and BAP is tested on integument cultures of *C. canephora* (Babu *et al.*, 1997). For the first time in any plant species, plant regeneration is achieved from integument tissues of CxR cultivar (Sreenath *et al.*, 1995).

Genetic improvement

With the objective of using the tissue culture technology for genetic improvement, research was done in embryo culture, anther culture and endosperm culture. The research has resulted in plant regeneration through embryo culture by direct germination as well as somatic embryogenesis (Muniswamy *et al.*,1993; Sreenath *et al.*, 1989; Muniswamy & Sreenath, 1997). Plants produced from the embryo culture have been established in the field. In addition to this, plants regenerated from 3 interspecific (Sreenath *et al.*, 1992) and 5 intervarietal crosses through embryo rescue methods are established in the field and are being evaluated. Plantlets have been regenerated from the anther culture of CxR cultivar (Muniswamy and Sreenath, communicated). This is the first achievement in a diploid species of coffee. Callus cultures were established from endosperm tissues (Raghuramulu, 1989) and plantlets are regenerated through embryogenesis from the endosperm calli of S. 2803 (Muniswamy & Sreenath, communicated).

Protocols have been optimized for isolation of protoplasts from embryogenic calli (Mamatha & Sreenath, 1998). DNA markers are becoming powerful tools in the hands of coffee breeders (Sreenath 1998a, 1999). Protocols have been developed for isolation of DNA and producing RAPD (Ram & Sreenath, communicated) and AFLP markers (Sreenath *et al.*, communicated). The RAPD markers are being used for evaluating leaf rust differentials and genetic fingerprinting. Genetic transformation protocols are being developed with the objective of genetic engineering of coffee. Transient expression of gus gene is achieved in leaf tissues of CxR cultivar after co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* (Naveen & Sreenath, unpublished).

***In vitro* preservation**

In vitro preservation of zygotic embryos upto 2 years under slow growth condition has been achieved in *C. arabica* (Naidu & Sreenath, communicated). Successful cryopreservation of zygotic embryos is achieved in three species (Krishna & Sreenath, unpublished).

FUTURE AREAS OF RESEARCH

There is great potential for application of biotechnology for genetic improvement of Indian coffee cultivars and growing coffee in an eco-friendly way. Results obtained so far are encouraging. Now the efforts are being focussed on converting the vast potential of biotechnology into reality.

Developing molecular markers linked to leaf rust resistance, characterization of coffee germplasm with DNA markers, engineering leaf rust resistance in coffee with antifungal genes from heterologous sources, isolation of genes of leaf rust resistance from resistant cultivars, developing Bt based biopesticides to combat major pests, engineering insect resistance using Bt and proteinase inhibitor genes, isolating caffeine degradation genes for manipulation of caffeine conten in the beans, are identified as thrust areas of coffee biotechnology research in India.

REFERENCES

Anonymous (1996). Coffee Guide, Central Coffee Research Institute, India.

Anonymous (1998). A compendium on pests and diseases of coffee and their management in India. Central Coffee Research Institute, India.

Babu KH, Shanta HM, Ganesh DS and Sreenath HL (1993). Plant regeneration through high frequency somatic embryogenesis from leaf tissues in two cultivars of coffee. J. Plantations Crops 21 (supp.): 307 -312.

Babu KH, Jayashree G, Naidu MM, Ganesh DS and Sreenath HL (1997). Effect of TIBA and BAP on integument cultures of CxR cultivar of robusta coffee *(Coffea canephora)*. In: GA Ravishankar and LV Venkataraman (Eds). Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell Culture. pp 296-300. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

Ganesh DS and Sreenath HL (1997). Shoot regeneration from apical bud and node cultures in four clones of robusta coffee *(Coffea canephora)*. In: GA Ravishankar and LV Venkataraman (Eds). Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell culture. pp 301-306. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

Jayashree G, Ganesh DS and Sreenath HL (1995). Effect of kinetin on germination of somatic embryos of CxR cultivar of coffee. J. Coffee Res. 25(2): 102-105.

Mamatha HN and Sreenath HL (1998). Optimization of conditions for isolation and culture of coffee protoplasts from embryogenic calli. Paper presented at the XIII PLACROSYM held at Coimbatore between 14-18 th December 1998.

Muniswamy B, Naidu MM and Sreenath HL (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature zygotic embryos of *Coffea canephora* Pierre. J. Plantation Crops 21 (suppl.): 346-350.

Muniswamy B, Naidu MM and Sreenath HL (1994). A simple procedure for hardening of *in-vitro* raised plantlets of *Coffea canephora*. J. Coffee Res. 24(1): 49-53.

Muniswamy B and Sreenath HL (1995a). Standardization of encapsulation techniques for producing synthetic seeds in coffee. J. Coffee Res. 25: 24-29.

Muniswamy B and Sreenath HL (1995b). High frequency somatic embryogenesis from cultured leaf explants of *Coffea canephora* on a single medium. J. Coffee Res. 25: 98-101.

Muniswamy B and Sreenath HL (1997). Genotype specificity of direct somatic embryogenesis from cultured embryos in coffee. In: GA Ravishankar and LV Venkataramanan (Eds). Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell Culture. pp. 204-209. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

Naidu MM, Ganesh DS, Jayashree G and Sreenath HL (1999). Effect of genotype on somatic embryogenesis and plant regeneration in arabica coffee. In: PB Kavi Kishor (Ed). Plant Tissue Culture and Biotechnology- Emerging Trends. pp. 90-95. Universities Press, Hyderabad.

Raghuramulu Y (1989). Anther and endopserm cultures of coffee. J. Coffee Res. 19: 71- 81.

Raghuramulu Y, Purushotham K, Sreenivasan MS and Ramaiah PK (1987). *In-vitro* regeneration of coffee plantlets in India. J. Coffee Res. 17: 57-64.

Sondahl MR and Lauritis JA (1992). Coffee. In: RE Por, Hammerschlog and RE Litz (Eds). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. pp. 401-420.

Sondahl MR and Loh WHT (1988). Coffee Biotechnology In: RJ Clarke and RE Litz (Eds). Coffee Agronomy Vol. 4: pp 236-262 Elevier Applied Science, London.

Sreenath HL (1998a). DNA marker techniques come to the help of coffee breeders. Indian Coffee LXII (2): 11-13.

Sreenath HL (1998 b). Micropropagation of superior coffee genotypes. Indian Coffee LXII (4): 17-19.

Sreenath HL (1999). Use of molecular markers in coffee. In: PB Kavi Kishor (Ed.) Plant Tissue Culture and Biotechnology – Emerging Trends. pp. 289-293. Universities Press (India) Ltd., Hyderabad.

Sreenath HL, Muniswamy B, Raghuramulu Y and Ramaiah PK (1989). Immature embryo culture in coffee. In: XIII Plant Tissue Culture Conference held Shillong from 18th-20th Dec. 1989. p. 17(Abstracts).

Sreenath HL, Muniswamy B, Naidu MM, Dharmaraj PS and Ramaiah PK (1992). Embryo culture of three interspecific crosses in coffee. J. Plantation Crops 20 (suppl.): 243-247.

Sreenath HL and Naidu R (1997). Quarter century of research in coffee biotechnology – a review. In: GA Ravishankar and LV Venkataraman (Eds). Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell Culture. pp. 14-27. Oxford IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.

Sreenath HL, Shantha HM, Babu KH and Naidu MM (1995). Somatic embryogenesis from integument (perisperm) cultures of coffee. Plant Cell Reports 14: 670-673.

Staritsky G (1970). Embryoid formation in callus cultures of coffee. Acta Botanica Neerlandica 19: 509- 514.

CUSTO DE PRODUÇÃO MANUAL DE SEMENTES HÍBRIDAS DE CAFÉ [1]

Sergio Fadelli [2] & Tumoru Sera[3]

[1] Trabalho financiado parcialmente pelo Consórcio de P & D Café; [2] Acadêmico de Eng. Agronômica/UEL, bolsista do PIBIC/CNPq/IAPAR; [3] Engº. Agrº., D. Sc., pesquisador do IAPAR

INTRODUÇÃO

Apesar do alto potencial produtivo de café alcançável palas cultivares de café recomendadas para o Paraná (> 75 sacas beneficiadas de 60 kg/ha/ano, incluindo anos sem produção decorrentes da poda) (SERA, 1995) a produtividade média estadual está muito aquém de uma cafeicultura racional e competitiva (14 sc/ha/ano, segundo DEMARCHI, 1998). Para melhorar esta situação, uma alternativa estuda é a formação de lavoura comercial tipo híbrido F_1, aproveitando a heterose normalmente observada nas hibridações, e melhorando, desta forma, a rentabilidade, principalmente nas pequenas e médias propriedades que representam a grande maioria da área cafeeira do Estado. Vários trabalhos tem mostrado a existência de heterose em *Coffea arabica* (SRINIVASAN & VISHVESHAVARA, 1978; ARAÚJO & NETO, 1980;WALYARO, 1983; AMEHA & BELACHEW, 1985; NETO et al., 1993; BERTRAND et al., 1997) com uma média superior a 30% e relato de até 236% em relação ao pai superior (WALYARO, 1983), podendo esta ser utilizada na obtenção de cultivares tipo híbrido F_1. Caso a venda da semente híbrida F_1 seja antieconômica, pode-se em alguns casos cultivar comercialmente as plantas híbridas F_2, aproveitando cerca de metade da heterose observado no híbrido F_1 (SERA & ALVES, 1999).

A lavoura comercial de híbridos F_1 pode, ainda, representar para o melhoramento genético uma grande economia de tempo com a redução do número de ciclos de seleção necessários para obtenção de cultivares do tipo linhagem (BERTHOULY, 1997) e permitindo que o melhorista possa testar diversas combinações de linhagens, lançando as mais promissoras como cultivares num período muito menor (SERA & ALVES, 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

Na hibridação manual foi usado o cruzamento simples entre as cultivares Mundo Novo (linhagem 376-4), Catuaí (linhagem H2077-2-5-81) e Icatu Precoce (linhagem 3282) como parentais femininos com as cultivares IAPAR 59 e Tupi como parentais masculinos. A emasculação e a polinização foram realizadas em duas floradas ocorridas em 1998. A emasculação foi realizada três a quatro dias antes da abertura das flores, conforme as condições climáticas atuavam sobre a fisiologia do cafeeiro, dando preferência para os ramos da metade da saia do lado de exposição ao sol pela manhã. A coleta do pólen ocorreu no final da tarde do dia anterior a abertura das flores quando estas se encontravam no estágio de botão floral desenvolvido. A polinização ocorreu no período mais quente do dia (a partir das 10:00 até o final da tarde). O acompanhamento e limpeza dos cruzamentos para eliminar frutos e flores provenientes de floradas anteriores e posteriores da florada em que foi realizado o cruzamento ocorreu em todo período que o cafeeiro floresceu em 1998 (agosto a dezembro), quatro a cinco dias antes da abertura das flores. A % de frutificação e de frutos "mocas" foi avaliada em janeiro (aproximadamente quatro meses após a polinização). Quando maduros os frutos provenientes dos cruzamentos serão colhidos, descascados, degomados e semeados em germinador de viveiro.

O custo de produção manual de sementes híbridas F_1 em café foi estimado através de duas equações propostas:

a)Determinação do n^0 de flores a serem emasculadas (E) para obter um Kg de semente:

$$E = S \div (1 - (b \div 2)) \div (1 - (c \div 2)) \div (1 - d)$$

S = n^0 de sementes /Kg (5.000 para cultivares de peneira 16, 4.500 para cultivares de peneira 17 e 4.000 para cultivares de peneira 18); **b** = taxa de frutos "moca" nos cruzamentos; **c** = taxa de frutos "chochos" nos cruzamentos e **d** = taxa de flores que não frutificaram.

b) Determinação do custo/kg de semente híbrida:

Somando-se o tempo gasto na emasculação, na polinização e na limpeza e dividindo o valor obtido pelo n^0 de horas efetivamente trabalhadas/dia/homem (no nosso caso adotamos seis horas/dia/homem) obtém-se o n^0 de diárias necessárias para produção manual de um kg de semente híbrida F_1. Multiplicando-se o valor de uma diária pelo n^0 de diárias necessárias para

produzir um kg de semente híbrida e por alguns fatores pode-se estimar o custo por kg de semente híbrida produzida:

$C = \{[(E \div x) + (E \div y) + z + p] \div 6_0\} \times t \times f \times k + s$

C = custo por kg de semente híbrida produzida manualmente (US$); **E** = nº de flores a emascular; **x** = velocidade de emasculação (flores/hora); **y** = velocidade de polinização (flores/hora), **z** = tempo gasto na limpeza dos cruzamentos (tempo médio gasto por limpeza x nº de limpezas realizadas/ano); **p** = tempo gasto na colheita, descasque e degomagem dos frutos; **t** = valor médio de uma diária (US$); **f** = n de sementes perdidas por outros fatores como quebra de ramo com cruzamentos, ataque de broca, estresse ambiental (queda fisiológica de frutos), etc.; **k** = fator que considera o nº de horas extras trabalhadas e **s** = custo dos materiais utilizados (sacos de papel, barbante, etiquetas, pinça e caixa plástica).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O **quadro 1** mostra valores médios de rendimento na emasculação, polinização e na limpeza (retirada das flores oriundas das floradas anteriores e posteriores da florada em que se realizou o cruzamento do ramo), dias úteis de emasculação e processamento das sementes para cada florada em cada cultivar utilizada como progenitor feminino. Esses valores confirmaram a expectativa de obtenção de maior rendimento na emasculação na maior florada do cafeeiro, exceto para o cultivar Catuaí que obteve resultados semelhantes nas duas floradas. Para a polinização não houve diferença entre as cultivares, sendo o seu rendimento determinado principalmente pelo clima do dia e quantidade de pólen por flor do progenitor masculino, não havendo, aparentemente, relação entre a classificação da florada com o seu rendimento.

Nas duas floradas avaliadas observou-se que a maior % de frutificação foram para os híbridos onde se utilizou como parental feminino o Catuaí, seguidos pelos híbridos com o Mundo Novo e Icatu Precoce, havendo pequena diferença utilizando-se polinizadores diferentes, na mesma cultivar (**Quadro 2**).

As diferenças na taxa de fertilização das flores nos cruzamentos dentro de uma mesma cultivar são conseqüências das condições em que se realizaram os cruzamentos (principalmente na polinização) em cada florada, como face de exposição ao sol, posição na planta do ramo em que foi realizado o cruzamento, horário, umidade e temperatura do dia em que se realizou a polinização. Nota-se uma igualdade na porcentagem de flores fertilizadas para as duas cultivares polinizadoras no Mundo Novo e Icatu Precoce, enquanto que no Catuaí a maior % de frutificação foi quando se utilizou o IAPAR 59 como polinizador. A % de frutos "moca" mostrou-se maior nos cruzamentos com maiores % de frutificação provavelmente causada pela insuficiência na nutrição e polinização.

Quadro 1: Rendimento de emasculação, polinização e limpeza dos cruzamentos e processamento das sementes, classificação da florada e dias úteis para emasculação em duas floradas do cafeeiro em 1998.

	Catuaí		Mundo Novo		Icatu Precoce	
Florada	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Emasculação[1]	252	266	311	238	414	219
Polinização[1]	630	399	574	327	596	394
Limpeza[2]	-	14	50	18	39	9
Coleta e processamento das sementes[3]	150	150	150	150	150	150
Dias úteis/emasc.	3	2	3	2	3	2
Classif./forada[4]	G	P/M	G	P/M	G	P/M

[1] flores/hora; [2] minutos; [3] minutos/kg de semente; [4] G = grande, P/M = pequena a média

Quadro 2: Porcentagem de frutificação e frutos "mocas" para seis híbridos de café em duas floradas do cafeeiro em 1998.

	% de frutificação			% de frutos "mocas"		
Florada	**1°**	**2°**	**Média**	**1°**	**2°**	**Média**
Mundo Novo X IAPAR 59	57,7	55,7	56,7	22,9	31,8	27,4
Mundo Novo X Tupi	40,7	65,9	53,3	17,8	10,3	14,1
Catuaí X IAPAR 59	76,7	60,2	68,45	27,8	22,0	24,9
Catuaí X Tupi	66,2	50,0	58,1	20,6	12,0	16,3
Icatu Precoce X IAPAR 59	42,1	70,1	56,1	30,9	0,0	15,5
Icatu Precoce X Tupi	-	57,9	57,9	-	12,1	12,1

Quadro 3: Estimativa do custo de um kg de semente híbrida produzida manualmente de seis híbridos em duas floradas do cafeeiro em 1998.

	Custo por kg (US$)[1]		**% de aumento do**
Híbrido	**1° florada[2]**	**2° florada[2] ( )[3]**	**custo na 2° florada[2] ( )[3]**
Mundo Novo X IAPAR 59	29,58	36,44 (43,31)	18,8 (31,7)
Mundo Novo X Tupi	31,74	31,29 (37,14)	-1,4 (14,5)
Catuaí X IAPAR 59	29,58	29,58 (35,09)	0,0 (15,7)
Catuaí X Tupi	30,95	30,72 (36,46)	-0,7 (15,1)
Icatu Precoce X IAPAR 59	28,16	28,44 (33,71)	1,0 (16,5)
Icatu Precoce X Tupi	-	35,29 (41,94)	-
Média	30,00	31,96 (37,89)	6,1 (20,8)

[1] US$1,00 = R$1,75; [2] k = 1,20; [3] k = 1,00

A primeira florada foi a que apresentou, em média, o menor custo/kg de semente híbrida (US$30,00), devido a maior velocidade de polinização e emasculação e polinização resultante de uma florada maior que a segunda. Na Segunda florada o custo foi 6,6% superior ao da primeira florada (US$31,96), embora essa diferença subisse para 20,8% se houvesse necessidade de horas extras em final de semana na segunda florada como ocorreu na primeira. Também, a diferença no custo entre sementes híbridas não é consistente é não significativa neste trabalho.

Quanto aos componentes do custo de produção manual de sementes híbridas (**Quadro 4**), destaca-se a emasculação como item mais pesado do custo (52.56%) devido a necessidade de rigor na retirada dos botões florais não desenvolvidos e frutos provenientes de outras floradas e necessidade de horas extras trabalhadas, uma vez que freqüentemente a florada cai em finais de semana.

O item mão de obra foi responsável por 84,68% do custo por kg de semente híbrida indicando a necessidade de novos estudos para melhorar e viabilizar de outras técnicas de emasculação como a genética (macho esterelidade), que representariauma diminuição de 52,56% do custo e a castração química e concentração de floradas (através de irrigação) como fonte de diminuir o custo por kg de semente híbrida produzida manualmente.

Quadro 4 : Componentes do custo de produção de um kg de sementes híbridas produzidas manualmente do híbrido Icatu Precoce x IAPAR 59 em um florada classificada como grande no ano de 1998.

Componente	Custo (US$)[1]	% do custo
Emasculação[2]	14,80	52,56
Polinização	7,27	25,83
Limpeza dos ramos	1,43	5,07
Coleta e processamento das sementes	2,38	8,46
Materiais utilizados	2,27	8,08
Total	18,16	100,00

[1] US$1,00 = R$1,75; [2] incluindo horas extras (US$4,31 e 15,32 do custo total do Kg de semente híbrida).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir, nas condições do ensaio que o custo de um kg de semente híbrida produzida manualmente fica em torno de US$30,00 nas floradas classificadas como grande (segunda e terceira florada do cafeeiro), onde se obtém os melhores rendimentos e menor custo por kg de semente híbrida produzida manualmente. Quanto aos componente de produção são necessários novos estudos, principalmente quanto a utilização de genes de macho esterelidade, emasculação química e concentração de floradas visando reduzir o custo por kg de semente híbrida tornando-a acessível aos cafeicultores.

LITERATURA CITADA

AMEHA, M.; BELACHEW, B. Heterosis for yield in crosses of indigenous coffe selected for yield and resistance to coffe berry disease.**ActaHorticultural,** Maastricht, Netherlands, v.158, 1985. p.247-351.

BERTHOULY, M. Biotecnologias y técnicas de reproducion se materiales promissores en *Coffea arabica*. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE CAFEICULTURA, 18, San José, Costa Rica. 1997. **Memórias.** San José:IICA-PROMECAFÉ, p.25-49. 1997.

BERTRAND, B.; AGUILAR, G.;SANTACREO, R.; ANTHONY, F.; ETIENNE, H.; ESKES, A. B.; CHARRIER, A. Comportement d'hybrides F1 de *Coffea arabica* pour la vigueur, la production et la fertilité em Amérique Centrale .In.:COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17, Nairobi, Kenya. 1997. **Trabalhos publicados.** Paris:ASIC, p.415-423. 1997.

DEMARCHI, M. Café. **Acompanhamento da situação agropecuária do Paraná,** Curitiba, Brasil, v. 24, n.1., 1998. p.13-26.

NETO, K. A.; MIGUEL, A. E.; QUEIROZ, A. R. Estudo de híbridos de *Coffea arabica* – Catimor versus Catuaí, Catindú versus Catuaí e outros. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19, Três Pontas. 1993. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro:MARA-PROCAFÉ, p.38-41. 1993.

NETO, K. A.; FERREIRA, J. B. D. Vigor de híbrido em cruzamentos de *Coffea arabica*. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 8, Campos do Jordão. 1980. **Resumos...** Rio de Janiero:IBC-GERCA, p.14-16. 1980.

SERA, T. Cultivares na nova cafeicultura para o Paraná. In.: ENCONTRO PARANAENSE DE CAFÉ, 2, Santo Antônio da Platina.1995. **Anais...** Santo Antônio da Platina:APAC, p.41-67. 1995.

SERA, T.; ALVES, S. J. Melhoramento genético de plantas perenes. In: DESTRO, D. & MONTALVÁN, R. (Org.). **Melhoramento genético de plantas.** Londrina:Ed. UEL, 1999. p.369-422.

SRINIVASAN, C. S.; VISHVASHWARA, S. Heterosis and stability for yeld in *arabica coffe*. **The Indian Journal Genetics & Plant Breeding,** New Delhi, Índia, v.38, n.3. Delhi, 1978. p.416-420.

WALYARO, D. J. A. **Consideration in breeding for improved yield on quality Arábica coffee (*Coffea arabica* L.).** Wageningen, Netherlands, 1983. Thesis (Doctoral in Genetic and Breeding) – Agricultural University.

ESTUDO DA CAPACIDADE COMBINATÓRIA E DA HETEROSE EM CRUZAMENTOS ENTRE LINHAGENS DE CATUAÍ E HÍBRIDO DE TIMOR, EM CAFÉ.

José Roberto M. Fontes[1], Antônio A. Cardoso[1], Cosme Damião Cruz[2] Laércio Zambolim[3], Ney S. Sakiyama[1], Antônio A. Pereira[4].

[1]DFT/UFV; [2]DBG/UFV; [3]DFP/UFV; [4]EPAMIG. 36571-000 - Viçosa-MG.Auxílio financeiro: FINEP, FAPEMIG, CNPq e PNP&DCafé

INTRODUÇÃO

A análise da capacidade combinatória é uma metodologia utilizada para identificar progenitores com capacidade de transmitir seus caracteres desejáveis a sua descendência, identificar a melhores combinações híbridas e adquirir informações sobre o tipo de ação gênica que controla os diferentes caracteres agronômicos. Em sua forma mais geral, capacidade combinatória ou habilidade combinatória refere-se ao comportamento de linhagens ou cultivares quando são usadas em combinações em um ou em vários sentidos, entre si, para obtenção de híbridos. Sendo a capacidade geral de combinação o comportamento de uma linhagem em sua série de cruzamentos, tomando por base o valor médio dos híbridos F_1 nestes cruzamentos. Já o desempenho de um cruzamento particular pode desviar-se da média da capacidade geral de combinação, e este desvio é conhecido como capacidade específica de combinação (ALLARD, 1971).

Os termos capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC) foram originalmente definidos por Sprague & Tatum, citados por MELO (1987), utilizando como método experimental um sistema de cruzamentos dialélicos. Os autores conceituam a CGC como o comportamento médio de uma linhagem em uma série de cruzamentos. Por sua vez, a CEC representa o desvio, para melhor ou pior, de um determinado cruzamento, tomando por base a média da CGC dos seus pais. Eles diferenciam, ainda, os tipos de capacidade combinatória considerando o modo de ação gênica envolvida. Por conseguinte, a CGC está associada a genes de efeitos principalmente aditivos, além da parte dos efeitos dominantes e epistáticos (aditivo X aditivo). De outro lado, a CEC depende basicamente de genes com efeito dominantes, epistáticos e vários tipos de interações.

Estudos sobre a capacidade específica de combinação de híbridos de *C. canephora* foram realizados por FAZUOLI & CARVALHO (1987). Verificou-se que as melhores combinações foram as de Kouillou x Robusta, BP46 x Kouillou, Uganda x SA158 e a da progênie de polinização livre de Uganda1646-4. Os autores mencionaram o descarte de várias combinações híbridas, que nada produziram ou produziram poucas sementes, que germinaram mal; sendo este fato atribuído à auto-incompatibilidade típica da espécie *C. canephora*. CILAS et alii (1998), também trabalhando com café, mostram que linhagens de baixo rendimento podem apresentar excelente performance como progenitores. Por outro lado, excelentes variedades podem ser péssimos progenitores. Por isso, tanto o estudo da CGC quanto da CEC são essenciais na escolha dos cruzamentos a serem realizados num programa de melhoramento.

Nos estudos de heterose, maior ênfase tem sido dada predominantemente às espécies alógamas, particularmente à cultura do milho, onde a heterose é explorada comercialmente. Entretanto, têm crescido as atenções dadas às espécies autógamas, motivada em parte pela possibilidade do desenvolvimento de sistemas efetivos para exploração comercial da heterose via híbridos F_1, também nestas espécies, e pelo potencial da utilização dos dados de rendimento de híbridos F_1 e outros materiais em gerações iniciais, permitindo ao melhorista dar prioridade aos melhores cruzamentos (SARAWAT et alii, 1994).

O valor da heterose é freqüentemente expresso em porcentagem, eliminando, assim a unidade usada para a determinação do caráter. Do ponto de vista prático, tem interesse o vigor do híbrido quando este é superior ao pai superior (heterobeltiose). Freqüentemente, um cruzamento pode exibir heterose, por ser mais produtivo do que a média dos pais, porém, se não for superior a um dos progenitores, pode não ter interesse prático (PATERNIANI, 1975).

Há muito, têm sido observado em várias espécies de plantas que cruzamentos entre progenitores geneticamente divergentes exibem maiores heteroses que cruzamentos entre progenitores do mesmo grupo (MILLER & MARANI, 1963). Portanto, nem todas as combinações híbridas exibem heterose, o que pode ser facilmente entendido, já que quanto mais geneticamente distintos forem os progenitores, maior probabilidade de contribuírem com alelos

diferentes, resultando em maior heterozigosidade no híbrido, e assim obter maior vigor, quer devido à heterozigosidade por si (genes heteróticos), quer devido a complementação dos genes para vigor (genes dominantes ou parcialmente dominantes para o vigor). De outro lado, progenitores aparentados terão muitos alelos em comum, reduzindo assim as possibilidades de heterose. Por isso, na escolha de linhagens e ou cultivares para hibridização, devem ser cuidadosamente escolhidas as que apresentarem divergências genéticas entre si e caracteres altamente desejáveis (PATERNIANI, 1975; GALVÊAS, 1988).

BELLACHEW et alii (1993) estudaram seis materiais silvestres de *C. arabica*, cruzados num dialelo parcial padrão. Os híbridos F_1 e seus progenitores foram avaliados para sete caracteres vegetativos para obter estimativas da heterose e da capacidade combinatória. Os híbridos F_1 apresentaram heterose positiva em relação ao melhor progenitor para todas as características estudadas, com valores variando de 3 a 18%. Sendo que o cruzamento P_1 x P_4 apresentou heterose de 69% para volume de raiz. Em todos os caracteres estudados, as maiores heterobeltioses foram observadas em certos cruzamentos nos quais os progenitores possuíam locais de origem e caracteres morfológicos distintos.

SRINIVASAN & VISHVESHWARA (1978) estudaram a heterose para rendimento de grãos em treze cruzamentos entre sete progenitores em *C. arábica* durante seis colheitas. Com relação à média das seis colheitas, cinco cruzamentos apresentaram heterose positiva em relação à média dos pais, e sete cruzamentos apresentaram heterobeltiose. Os autores encontraram valores de heterose de até 183,3 % em relação a média parental e de até 100,41 % em relação ao melhor parental, no F_1 obtido do cruzamento entre *Agaro* x *2045*. Tanto o progenitor *Agaro* quanto o *Choeche*, que fez parte do cruzamento que apresentou a segunda melhor heterose, foram diretamente introduzidos da Etiópia. Os híbridos F_1 mais heteróticos possuíam, também, excelente estabilidade; com possibilidade de aumento na produção e aquisição de rendimentos estáveis em café arábica.

BELLACHEW (1997) estudou aproximadamente 2.789 acessos silvestres e exóticos de *C. arabica* provenientes da Etiópia, resultando em 279 materiais promissores. O autor relata a existência de heterose, obtidas em híbridos F_1, de 69% para características do grão e de 60% para produção.

Este trabalho teve por objetivo estimar a capacidade de combinação geral e específica, entre linhagens de Catuaí e descendentes do Híbrido de Timor, e a heterose e heterobeltiose nos híbridos F_1.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando os cafeeiros resistentes à ferrugem selecionados no germoplasma introduzido na Universidade Federal de Viçosa, iniciou-se, a partir de 1974, a síntese de novas combinações genéticas portadoras de resistência à ferrugem do cafeeiro. Essas novas combinações são resultantes do intercruzamento dos cafeeiros resistente e cruzamentos destes com cafeeiros das variedades comerciais do Catuai, Mundo Novo e Bourbon, visando a síntese de genótipos com resistência mais completa e transferência dos fatores de resistência, respectivamente.

Os cultivares Catuai Vermelho e Catuai Amarelo que participaram dos cruzamentos fazem parte do ensaio de linhagens, implantado em 1978, em Viçosa, onde foram avaliadas 12 progênies de Catuai (6 progênies de Catuai Vermelho e 6 progênies de Catuai Amarelo).

Essas combinações, após avaliadas quanto a ferrugem, através de inoculação artificial, foram plantadas nos chamados Campos de Seleção de Híbridos (CSH) para avaliação do comportamento nas condições de cultivo. Atualmente, estão sendo acompanhadas, nos campos CSH1 ao CSH10, plantas em geração F_1; já havendo outros campos em gerações mais avançadas.

Procurando realizar uma reorganização deste campos de seleção de híbridos, iniciou-se um trabalho de estudo dos dados de produção dos diferentes híbridos existentes. Neste trabalho foram estudados os híbridos F_1 provenientes dos cruzamentos entre variedades de Catuai com descendentes do Híbrido de Timor. Este material faz parte dos Campos de Seleção de Híbridos, do Programa de Melhoramento UFV/EPAMIG, na Estação de Pesquisa de São José do Triunfo, distrito de Viçosa, M.G.

Foram estudados um total de 74 híbridos, descendentes dos cruzamentos envolvendo 14 linhagens de Catuai (Vermelho e Amarelo) e 12 progênies descendentes do Híbrido de Timor. A avaliação dos cafeeiros foi realizada através da produção média acumulada, em gramas de café cereja.

Foram utilizadas como testemunhas três linhagens do cultivar Catuaí, UFV2145, UFV2114 e UFV2154.

Foi calculada a heterose através do desvio da geração F_1 em relação à média dos parentais (H_{mp}; mp=100) e a heterobeltiose (H_{ps}; ps=100), heterose em relação ao pai superior, visando avaliar melhor o valor prático da heterose.

Os dados da capacidade geral de combinação foram obtidos através do cálculo da produção baseada na média dos valores de todos os cruzamentos em que o progenitor estudado participou.

Foi realizada uma análise descritiva a partir dos dados das quatro primeiras colheitas; sendo que alguns híbridos foram avaliados também nos seis oito e até a dez anos de colheita.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A grande maioria dos híbridos apresentaram produção média acumulada superiores às testemunhas. O híbrido H427, que apresentou a mesma produção acumulada da melhor testemunha (UFV 2114), nos quatro primeiros anos (13613g), a superou em 34,3% na produção acumulada dos primeiros seis anos (29047g) e superou em 46,0% a outra melhor testemunha (UFV 2145), nos primeiros oito anos (39280g).

Dentre as plantas mais produtivas dos híbridos estudados, a UFV341-11, foi a planta mais produtiva nos quatro, seis e oito primeiros anos de produção acumulada. Esta planta superou em 28,7% e 19,1% a melhor planta da melhor testemunha (2114-14), na produção acumulada dos primeiros quatro e seis anos, respectivamente, e em 43,2% a melhor planta da outra melhor testemunha (2145-4), nos primeiros oito anos.

Vários autores têm observado a superioridade dos híbridos em relação às variedades testemunhas utilizadas, normalmente variedades comerciais. BERTRAND et alii (1997) estudaram híbridos F_1 provenientes de vários cruzamentos entre variedades tradicionais (Caturra, Catuaí) ou alguns derivados do Híbrido de Timor (Catimor, Sarchimor) e cafeeiros silvestres da Etiópia e Sudão, e observaram que os híbridos foram mais vigorosos e mais produtivos que as melhores variedades existentes.

Os valores de heterose e heterobeltiose, baseados na produção acumulada das plantas dos híbridos F_1, que apresentaram as maiores produções, durante os dez primeiros anos de coleta de dados, são apresentados a seguir (Quadro 01). Os valores foram agrupados em biênios, devido à característica bianual de produção do cafeeiro. 60% destas melhores plantas apresentaram heterose acima de 100%.

Quadro 01 - Valores de heterose (HT) e heterobeltiose (HTB), em porcentagem, baseados na produção acumulada das melhores plantas dos híbridos F_1, provenientes de cruzamentos entre Catuai e Híbrido de Timor, no período de dez anos, no Centro Experimental de São José do Triunfo-UFV/EPAMIG

4 Anos			**6 Anos**			**8 Anos**			**10 Anos**		
(UFV)	HT	HTB	(UFV)	HT	HTB	(UFV)	HT	HTB	(UFV)	HT	HTB
287-3	267	182	505-9	269	202	427-2	377	205	429-1	339	330
507-3	240	109	415-3	254	129	429-1	374	281	418-6	323	217
498-11	214	173	427-2	226	210	506-3	339	230	506-3	281	230
504-7	184	163	322-6	200	115	430-1	339	229	430-1	264	254
428-7	155	133	426-5	195	145	415-1	323	251	505-1	240	168
505-9	153	146	416-6	194	166	511-1	308	246	506-9	234	190
518-6	153	139	418-6	180	147	429-2	300	221	419-8	232	205
499-1	142	95	418-5	178	145	506-9	297	198	419-10	230	204
518-8	133	121	518-5	174	140	429-5	292	215	430-8	218	209
518-5	126	113	518-6	174	140	427-1	282	145	430-7	204	195
511-4	123	91	428-1	174	94	419-10	279	230	429-3	195	189
416-6	121	86	504-7	169	166	506-4	279	185	514-6	191	162
416-4	104	72	416-4	164	139	419-8	272	223	426-5	187	166
341-11	77	30	498-11	162	145	423-6	269	132	505-2	187	126
423-3	75	39	341-11	149	77	498-4	255	123	498-7	186	144
335-5	55	36	334-9	136	121	418-6	251	221	426-3	161	142
322-6	50	11	419-8	129	105	428-1	242	224	423-6	161	117
348-5	39	-7	499-1	120	102	322-6	241	187	506-10	160	125
341-6	38	1	423-3	115	97	423-10	239	114	419-5	154	134
342-2	16	9	341-6	105	45	416-6	202	140	423-10	152	110
342-8	12	4	348-1	93	46	416-4	197	136	498-6	150	113
347-4	4	-16	342-8	78	52	341-11	176	125	510-5	133	121
337-10	-	-	342-2	69	44	426-5	170	167	421-3	115	97
513-5	-	-	331-3	54	34	438-3	139	129	423-2	90	58
338-1	-	-	513-5	-	-	341-6	124	83	513-3	-	-

VAN DER VOSSEN (1985) mostra evidências consideráveis do vigor híbrido devido ao efeito de genes epistáticos complementares, para rendimento, particularmente em híbridos F_1, originados de cruzamentos entre variedades de origens diversas. O autor apresenta dados acumulados das três primeiras colheitas de variedades e híbridos F_1 de café arábica em duas densidades de plantio. Os híbridos F_1 produziram até 120% a mais que a média parental (Laurina x Híbrido de Timor), para a densidade de 3.333 plantas/ha, e até 109% a mais (SL28 x Rume Sudan), para a densidade de 6.667 plantas/ha. As melhores produções, no entanto, foram obtidas pelos híbridos "Pandang" x "SL34" (15,4% de heterose) e "Pandang" x "Erecta" (38% de heterose), para a menor e a maior densidade de plantio, respectivamente. Entre as variedades, "Pandang" foi a mais produtiva nas duas densidades estudadas.

Das progênies que foram avaliadas em até oito anos de produção, destacaram-se os híbridos: UFV416-6, UFV416-4, UFV322-6, UFV341-11 e UFV341-6, que apresentaram as melhores heteroses nos quatro, seis e oito anos de avaliação, UFV418-6 e UFV419-8, que apresentaram as melhores heteroses nos seis, oito e dez anos de avaliação, e UFV287-3, que apresentou heterose de 267% na avaliação dos quatro anos (período em que foi avaliado). Destacaram-se também os híbridos UFV504-7, UFV505-9, UFV518-6, UFV518-5, UFV342-2 e UFV342-8, que apresentaram heteroses consideráveis, baseadas na produção acumulada dos quatro e seis anos.

O híbrido UFV427-2, apesar de não aparecer entre os melhores nos primeiros quatro anos, apresentou excelente heterose nos dois biênios seguintes, principalmente nos oito anos com uma heterose de 377% (maior heterose encontrada)

Dentre as progênies que apresentaram as melhores heteroses, encontram-se algumas daquelas que apresentaram também as melhores produções, são elas: UFV341-11, UFV341-6, UFV504-7, UFV342-8, UFV518-6, UFV416-6 e UFV416-4. Através do estudo das produções obtidas pelos parentais destas progênies, foi observado que os mesmos apresentaram baixa produção média, indicando que a elevada produção obtida pelas progênies foi devido ao efeito da heterose manifestada nas mesmas e não por descenderem de pais com elevada capacidade produtiva.

Quando comparamos as produções dos híbridos F_1 com o melhor progenitor (heterobeltiose), na maioria das vezes, Catuai, a diferença é reduzida; mostrando que a produção do progenitor Híbrido de Timor é que provocava uma redução no valor da média. No entanto, a superioridade de várias progênies F_1, principalmente nos primeiros anos de produção, é confirmada, independente da baixa produção de um dos progenitores.

Os valores de heterobeltiose obtidos neste trabalho confirmam a superioridade das progênies citadas anteriormente, mas devemos observar que possíveis alterações na classificação das mesmas ocorrerão se esta classificação for baseada nas melhores heterobeltioses. Assim, os valores de heterobeltiose também devem ser levados em consideração, pois, na prática, o que interessa é um híbrido que também supere o parental mais produtivo (valor prático).

MARTINEZ et alii (1988) observaram que a heterose, com relação à média parental, variou de 105 a 169%, para uma média geral de 123%. Em relação ao pai superior, o valor médio da heterose foi de 102%.

Os dados da capacidade geral de combinação, baseados na produção média acumulada, se encontram no Quadro 02.

Quadro 02 - Classificação dos progenitores Catuai e Híbrido de Timor, em ordem decrescente, baseada na Capacidade Geral de Combinação, em valores de produção média acumulada, em g de café cereja, no período de dez anos, no Centro Experimental de São José do Triunfo - UFV/EPAMIG

CATUAI							
(UFV)	4 Anos	(UFV)	6 Anos	(UFV)	8 Anos	(UFV)	10 Anos
2144-35	13063	2144-35	22664	2145-113	33217	2145-113	43437
2147-295	11417	2145-113	22607	2148-57	31931	2145-79	40720
2143-235	11006	2143-235	20716	2145-79	31336	2143-235	40061
2144-36	10999	2147-295	20011	2143-235	29557	2143-236	36150
2145-79	10906	2148-57	19698	2144-141	29511	2148-57	33336
2145-113	10652	2145-79	19060	2143-236	27459	-	-
2148-57	10421	2144-141	18774	2145-307	26966	-	-
2144-32	10370	2143-236	18753	2147-295	26236	-	-
2144-141	10014	2154-344	18655	2144-32	23826	-	-
2154-344	9662	2144-32	18641	-	-	-	-
2144-71	9325	2145-307	18337	-	-	-	-
2145-307	8775	2144-36	16388	-	-	-	-
2143-236	8661	2144-71	14923	-	-	-	-
2246-139	8633	-	-	-	-	-	-
Média	10278,9		19171,3		28893,2		38740,8
						Média Geral	20655,46
HÍBRIDO DE TIMOR							
(UFV)	4 Anos	(UFV)	6 Anos	(UFV)	8 Anos	(UFV)	10 Anos
378-33	13636	445-46	23088	445-46	31488	446-8	37107
445-46	12220	378-33	22846	430-19	31188	439-2	36308
832-1	11701	440-10	20623	446-8	30490	-	-
440-10	11310	450-61	20091	440-10	29047	-	-
446-8	11056	446-8	19888	832-2	28334	-	-
450-61	10748	439-2	19635	450-61	26409	-	-
439-2	10459	430-19	18919	439-2	24336	-	-
832-2	9917	832-2	18436	450-63	23716	-	-
430-19	9742	832-1	16491	449-62	21518	-	-
450-63	8911	450-63	15516	-	-	-	-
449-62	8458	449-62	14717	-	-	-	-
376-2	6779	376-2	13147	-	-	-	-
Média	10411,4		18616,4		27391,8		36705,5
						Média Geral	19093,57

Podemos observar que, para os progenitores do cultivar Catuai, o UFV 2144-35 se destacou nos primeiros quatro e seis anos, período em que foi avaliado, e o UFV 2145-113 se destacou nos seis, oito e dez anos de avaliação; sendo ambos os progenitores cultivares de Catuai vermelho. Para os progenitores de Híbrido de Timor, o UFV 378-33 se destacou nos primeiros quatro e seis anos de produção, período em que foi avaliado, e o UFV 445-46 se destacou nos primeiros quatro, seis e oito anos de produção, não sendo avaliado no décimo ano de produção.

Quanto à capacidade específica de combinação, deve-se ressaltar que algumas das combinações híbridas possíveis não foram avaliadas neste trabalho por não haver representantes das mesmas na população estudada. Sendo assim, deve-se considerar também a possibilidade de serem as combinações híbridas ausentes superiores às progênies citadas como melhores neste trabalho; já que alguns dos progenitores Catuai com boas produções não possuem progênies que os representem em cruzamentos com os progenitores Híbrido de Timor também com boas produções, e vice-versa.

No estudo da capacidade específica de combinação, baseada na produção média das progênies F_1, o cruzamento UFV2144-36 x UFV439-2, nos primeiros quatro e seis anos de colheita, e o cruzamento UFV2148-57 x UFV439-2, nos oito anos, foram os melhores.

Dentre as melhores combinações específicas, baseadas na produção da progênie F_1, estão os cruzamentos: UFV2246-139 x UFV430-19, nos

primeiros quatro anos, UFV2144-36 x UFV439-2, UFV2144-35 x UFV445-46 e UFV2144-141 x UFV439-2, nos seis anos, UFV2143-235 x UFV445-46, nos oito anos, e UFV2145-79 x UFV446-8, no dez anos de produção acumulada.

Segundo Cruz e Regazzi, citados por CAVALCANTI et alii (1997), o melhor híbrido é aquele que apresenta a maior estimativa da capacidade específica de combinação e que pelo menos um dos pais possui alta estimativa da capacidade geral de combinação. Assim sendo, o híbrido proveniente do cruzamento UFV2144-35 x UFV445-46, que se destacou nos seis anos de produção acumulada, deve ser considerado o melhor, pois, além de apresentar uma excelente estimativa da CEC, ambos os seus progenitores possuíram elevada estimativa da CGC.

BIIBLIOGRAFIA

ALLARD, R. W. Princípios do Melhoramento Genético das Plantas. Trad. Almiro Blumenschein, Ernesto Paterniani, José T. do Amaral Gurgel e Roland Vencovsky. Agência Norte-Americana para o Desenvolvimento Internacional-USAID e Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 1971. 381p.

BELLACHEW, B. Arabica coffee breeding in Ethiopia: a review. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 17º, Nairobi, 1997. Resumos... , Paris, Association Scientifique Internacionale du Café (ASIC),1997. p.415-423. (CAB Abstracts)

BELLACHEW, B.; AMEHA, M.; MEKONNEN, D. Heterosis and combining ability in coffee (*Coffea arabica* L.). In: Colloque Scientifique International sur le Cafe, 15º, Montpellier, 1993 Resumos..., , Paris, Association Scientifique Internacionale du café (ASIC), 1993. p.A9.

BERTRAND, B.; AGUILAR, G.; SANTACREO, R.; ANTHONY, F.; ETIENNE, H.; ESKES, A. B.; CHARRIER, A. Comportement d'hybrides F_1 de *Coffea arabica* pour la vigueur, la production et la fertilité en Amérique Centrale. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 17º, Nairobi, 1997. Trabalhos publicados..., Paris, Association Scientifique Internacionale du Café (ASIC), 1997 p.415-423.

CAVALCANTI, J. J. V.; PINTO, C. A. B. P.; CRISÓSTOMO, J. R.; FERREIRA, D. F. Capacidade de combinação do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em relação à produção precoce de castanha. *Revista Ceres*, 44(254):466-472, 1997.

CILAS, C.; BOUHARMONT, P.; BOCCARA, M.; ESKES, A. B.; BARADAT, Ph. Prediction of genetic value for coffee production in *Coffea arabica* from a half-diallel with lines and hybrids. Euphytica 104(1):49-59, 1998.

FAZUOLI, L. C. & CARVALHO, A. Capacidade de combinação de híbridos de *Coffea canephora*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 14, Campinas, 1987. Resumos..., Campinas, IBC, 1987. p.93-95.

GALVÊAS, P. A. O. Características Agronômicas de Sete Cultivares de Pimentão (*Capsicum annum* L.) e Heterose dos Seus Híbridos F_1. Viçosa, UFV, 1988. 83p. (Tese M.S.)

MARTINEZ, O.; TORREGROZA, M.; RONCALLO, E. J. Heterosis en cruzamientos varietales de maiz de amplia diversidad genética y geográfica. *Agronomía Colombiana*, 5 (1-2):48-52, 1988.

MELO, P. C. T. de. Heterose e Capacidade Combinatória em um Cruzamento Dialélico Parcial Entre Seis Cultivares de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Piracicaba, ESALQ, 1987. 108p. (Tese D. S.)

MILLER, P. A. & MARANI, A. Heterosis and combining ability in diallel crosses of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Crop Science* 3(5):441-444, 1963.

PATERNIANI, E. Estudos recentes sobre heterose - Projeto Nacional de Feijão. Fundação Cargill, 1975. 36p. (Boletim Técnico)

SARAWAT, P.; STODDARD, F. L.; MARSHAL, D. R.; ALI, S. M. Heterosis for yield and related characters in pea. *Euphytica* 80:39-48, 1994.

SRINIVASAN, C. S. & VISHVESHWARA, S. Heterosis and stability for yield in Arabica coffee. *Indian Journal of Genetics & Plant Breeding* 38(3):416-420, 1978.

VAN DER VOSSEN, H. A. M. Coffee Selection and Breeding. In: M. N. Clifford & K. C. Wilson (Eds) Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. Croom Helm, London & Sydney, 1985. p48-96.

RESISTÊNCIA DE CLONES DE *C. canephora* VAR. CONILLON A *Hemileia vastatrix* BERK. & BR.

Dalza G. da Silva[1,3], Laércio Zambolim[1,3], Ney S. Sakiyama[1,2], Antônio A. Pereira[4], Aymbiré F. A. Fonseca[2,5], Terezinha A. Teixeira[1,2], Cássia C. H. Sakiyama[1].

[1]BIOAGRO/UFV; [2]DFT/UFV; [3]DFP/UFV; [4]EPAMIG; [5]EMCAPER.
36571-000 Viçosa, MG

Apoio Financeiro: FAPEMIG, FINEP, CNPq, PNP & DCafé

INTRODUÇÃO

No Brasil, a variedade Conillon de *Coffea canephora* é a mais cultivada, sendo o estado do Espírito Santo responsável por 80% da produção nacional (Matiello, 1998 e Costa *et al.*, 1995). Porém, a produtividade das lavouras capixabas formadas por mudas oriundas de sementes é baixa, aproximadamente 7 sc. benef./ha (Bragança et al., 1993).

A espécie *Coffea canephora* é diplóide (2n = 22 cromossomos), alógama e auto-incompatível contribuindo para a formação de lavouras heterogêneas em relação a resistência à ferrugem, época de colheita, uniformidade de maturação dos frutos, arquitetura das plantas e produtividade, resultando em um produto de baixa qualidade (Bragança et al., 1993).

Com a finalidade de solucionar esses problemas, a Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária lançou em 1993 as variedades clonais 'EMCAPA 8111', 'EMCAPA 8121' e 'EMCAPA 8131', de ciclo de maturação precoce, médio e tardio, constituídas de 10, 15 e 14 clones respectivamente, obtidos através da seleção e multiplicação vegetativa por estaquia, de plantas matrizes selecionadas em lavouras comerciais em vários municípios produtores do Norte do Estado.

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a resistência desses clones a quatro raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* Berk. e Br.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram avaliados 33 clones que compõem as variedades clonais 'EMCAPA 8111', 'EMCAPA 8121' e 'EMCAPA 8131', de ciclo de maturação precoce, médio e tardio, respectivamente (Quadro 1), obtidos por meio de seleção de plantas matrizes com características de alta produção, resistência a patógenos e uniformidade de maturação.

Quadro 1- Composição das variedades clonais de *C. canephora* utilizados no estudo da resistência a *H. vastatrix*.

'EMCAPA 8111'	'EMCAPA 8121'	'EMCAPA 8131'
02	07	31
03	11	45
26	14	46
29	16	49
36	19	99
104-A	109-A	100
104-A	110-A	106
110-B	112	116
154	120	139
	128	143
	132	153
	149	
	201	

Fonte: Adaptado de Bragança et al., 1993

Quando as mudas apresentavam 3 a 4 pares de folhas, foram transplantadas para vasos de 3 l de capacidade, contendo substrato na proporção de 700 l de terra de camada sub-superficial, 250 l de esterco de curral e 1,5 Kg de superfosfato simples, tratado com brometo de metila. Foram utilizadas as raças fisiológicas I, II, III e XIII de *H. vastatrix*, pertencente ao banco de raças de Departamento de Fitopatologia da UFV, mantidas em plantas da variedade Catuaí Vermelho (UFV-2144) e em clones diferenciadores. Os urediniosporos coletados foram submetidos ao teste de germinação em ágar 2%, imediatamente antes de proceder à inoculação nas plantas a serem avaliadas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 33 tratamentos e 4 repetições, utilizando a linhagem UFV-2144 como testemunha. A face abaxial do par de folhas jovens e bem desenvolvidas foi inoculado com aproximadamente 1 mg de urediniosporos, distribuídos com auxílio de pincel 'Tigre' nº 6. As plantas inoculadas foram mantidas em câmaras de nevoeiro a 25°C, 100% de umidade relativa e

ausência de luminosidade, por um período de 72 h, e após este período, transferidas para casa-de-vegetação.

A avaliação das interações patógeno-hospedeiro foi realizada semanalmente, a partir do 20º dia após a inoculação, até 60 dias, empregando a escala de tipos de reações adaptada por Tamayo (1988) das escalas de D'Oliveira (1954), Eskes (1983) e Abreu (1988), onde os valores de 1 a 3 = reação de resistência e de 4 a 6 = reação de suscetibilidade. Os resultados foram analisados baseando-se na estimativa do intervalo de confiança (IC), do grau médio de doença de cada clone, na última data de avaliação (60 dias após a inoculação), empregando a fórmula: X

$$P\left(\bar{X} - t \times \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + t \times \frac{s}{\sqrt{n}}\right) = 1 - \alpha$$

onde,

x = grau médio da doença no clone
s = desvio-padrão dos graus de doença no clone
n = número de plantas avaliadas

$t = t\alpha\ (n - 1)$

O nível de significância foi de α = 5%, permitindo inferir que existe uma probabilidade de 95% do IC conter a verdadeira média do grau de doença à respectiva raça.

A avaliação da variabilidade genética inter e intraclones foi realizada por meio de marcadores RAPD ("Randomm Amplified Polymorphic DNA"),de acordo com Williams et al. 1990, com algumas modificações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o grau médio de doença, os resultados mostraram que dos nove clones que compõem a variedade EMCAPA 8111, 100%, 50,50%, 22,22% e 10% foram suscetíveis às raças III, II, XIII e I, respectivamente. Com relação aos 13 clones que compõem a variedade EMCAPA 8121, 76,90% foram suscetíveis às raças II e III; 61,53% à raça XIII e 30,77% à raça I. Dos 11 clones que compõem a variedade EMCAPA 8113, encontrou-se que, 81,81%, 63,63%, 54,55% e 10% dos clones foram suscetíveis às raças III, II, I e XIII, respectivamente. Os resultados indicaram que as variedades clonais são compostas por clones resistentes e suscetíveis às raças de *H. vastatrix* inoculadas. Observou-se variabilidade genética intraclones quando inoculados com as respectivas raças fisiológicas de *H. vastarix*, mostrado pela diferenciação nas respostas à infecção e pelo desvio padrão das notas da escala de avaliação. Esses resultados foram observados nos clones 02, 110-B e 139, quando inoculados com a raça fisiológica I; clones 104-A, 14 e 153, quando inoculados com a raça II; clones 03, 29 e 104-B quando inoculados com a raça III; clones 14, 19, 31, 49, 110-A, 116 e 120 quando inoculados com a raça XIII. Marcadores RAPD utilizados na avaliação de diversidade de clones demonstraram ser eficazes no agrupamento de plantas dentro de cada clone. Verificou-se também, a exemplo dos resultados com inoculação, que alguns indivíduos mostraram-se geneticamente diferentes das demais plantas pertencentes a um mesmo clone, como observados nos clones 02, 03, 104-A, 139 e 36. Conclui-se que a resistência à ferrugem do cafeeiro em clones da variedade Conillon deve ser estudada mais detalhadamente, com vistas à obtenção de clones com maior nível e durabilidade de resistência a *H. vastatrix*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, M. S. (1988) Resistência horizontal a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cafeeiros descendentes do Híbrido de Timor. Tese DS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 68 p.

Bragança, S. M.; Carvalho, C.H.S.; Fonseca, A.F.A; Ferrão, R.G. & Silveira, J. S. M. (1993) 'EMCAPA 8111', EMCAPA 8121', EMCAPA 8131': Primeiras variedades clonais de café conilon lançadas para o Espírito Santo. Comunicado Técnico, nº 68 junho/93 p. 1/2 EMCAPA. ISSN 0101 – 7683.

Costa, E.B. da (1995) Manual técnico para a cultura do café no Estado do Espírito Santo. Vitória, ES: SEAG-ES,. 163 p.il.

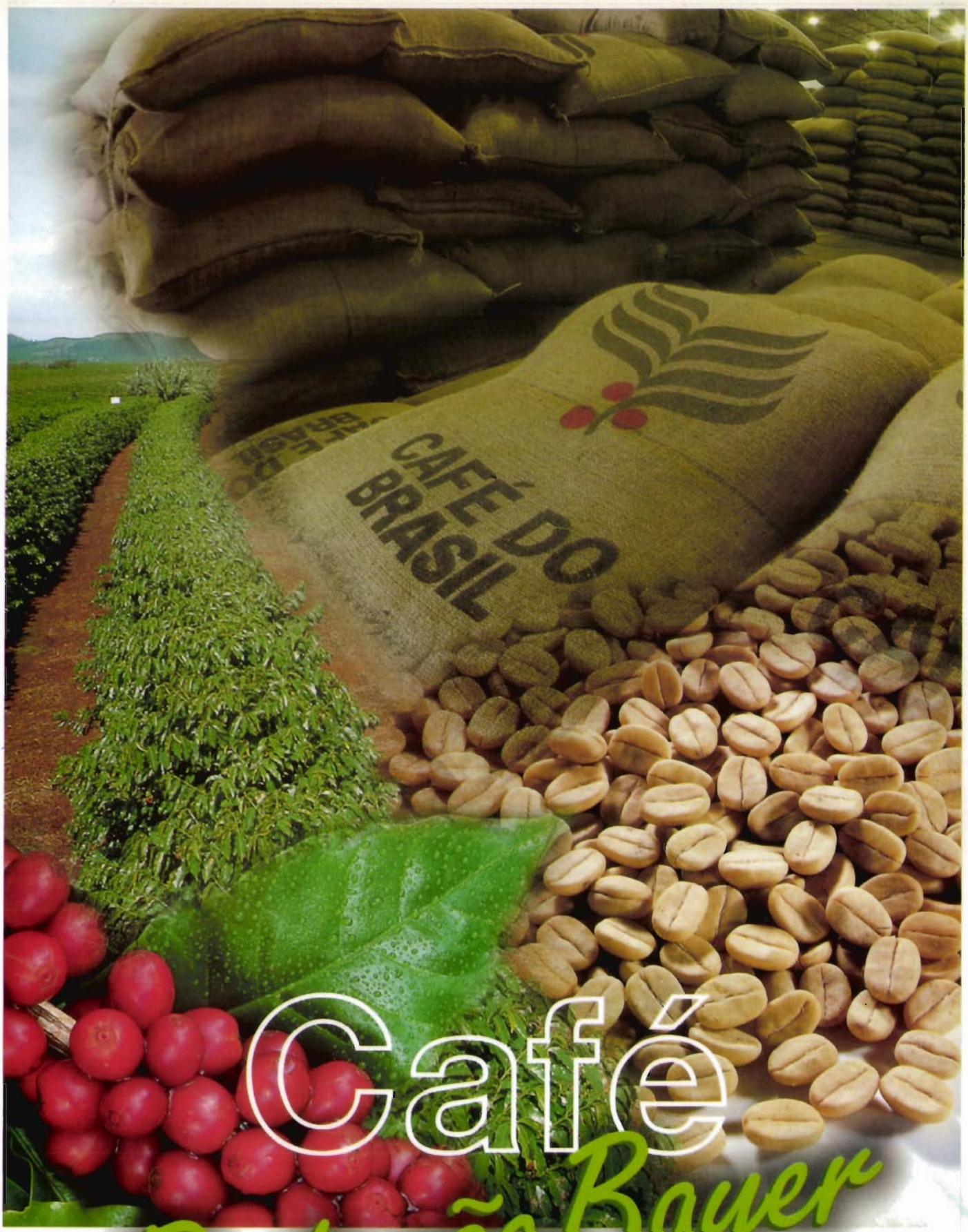
D'Oliveira, B. (1954) As ferrugens do cafeeiro. Oeiras, Junta de Investigações do Ultramar, CIFC, s.d., 61 p. Separata da Revista do Café Português. 1: 5-12.

Eskes, A. B. (1983) Incomplete resistance to coffee leaf rust, Doctoral thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 140 p.

Tamayo, P. J. (1988) Resistência de progênies de catimor a oito raças de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., Tese MS, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 64 p.

Zambolim, L.; Vale, F. X. R.; Pereira, A.A. & Chaves, G. M. (1997) CAFÉ. In. Controle de doenças de plantas. Ed. Vale & Zambolim p. 83-179. v.1, 554p.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafaslsk, J. A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535



Café

Proteção Bayer

Bayer

Proteção das Plantas

EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFÉ, *Hypothenemus hampei*, EN COLOMBIA.

Alex E. Bustillo P.

El café es el cultivo de exportación más importante de Colombia. Su importancia aumenta si consideramos el aspecto socioeconómico ya que mantiene muchas familias en el campo y genera millones de empleos directos e indirectos. La plaga más importante de este cultivo es la broca del café, ***Hypothenemus hampei*** (Ferrari). Este insecto produce caída y pérdida en el peso de los frutos cosechados, pero más importante es la pérdida que causa en la calidad de la bebida. La dependencia unilateral en el uso del control químico para el combate de este insecto no es aconsejable, por eso se sugiere la implementación de un programa de manejo integrado fundamentado en el control biológico, para lograr una reducción en los costos de producción, agregando una base ecológica y mejorando así la calidad del café producido.

La broca del café es una de las plagas más importantes del café en el mundo (Le Pelley, 1968). Al continente americano fue introducida desde Africa a través del Brasil en 1923 y se encuentra distribuida en casi todos los países productores de café. Hasta el presente no se tiene información de su presencia en Costa Rica y Panamá. Las hembras de la broca son las que inician el ataque al perforar los frutos en la región del disco de la corona del fruto, llegando de esta forma al endospermo formando una cámara donde depositan los huevos, de los cuales emergen las larvas que destruyen gran parte de la semilla, por esto causan pérdidas en su peso. El ataque a frutos con menos de tres meses de edad se traduce en la caída de estos. Las perforaciones a los frutos abren una puerta de entrada a agentes patogénicos que demeritan la calidad del café.

El insecticida más utilizado en el control de broca ha sido el endosulfan, pero el reciente descubrimiento del desarrollo de resistencia de la broca a este producto (Brun *et al.*, 1989), la amenaza al equilibrio biológico y los riesgos toxicológicos en la zona cafetera, han llevado a muchos países como México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Honduras y Colombia a introducir parasitoides de Africa para desarrollar programas de control biológico.

La broca llegó a Colombia en 1988 y desde esa época la Federación Nacional de Cafeteros inició un programa de investigaciones en control biológico con la introducción de parasitoides, el desarrollo de un micopesticida a base de ***Beauveria bassiana*** y la búsqueda de alternativas de insecticidas de menor categoría toxicológica.

USO DE PARASITOIDES

Cuando la broca se introdujo de Africa a América, no vino con sus enemigos naturales que normalmente ocurren en su lugar de origen. Los parasitoides de la broca hasta el presente encontrados son originarios de Africa Central, lugar que también es considerado el sitio de origen de la broca. Estos parasitoides son ***Prorops nasuta*** Waterston (Bethylidae), ***Heterospilus coffeicola*** Schmeideknecht (Braconidae) ambos encontrados por Heargraves en 1923 y 1924 respectivamente, ***Cephalonomia stephanoderis*** Betrem (Bethylidae) fue encontrado en 1960 por Ticheler (1963), y ***Phymastichus coffea*** La Salle (Eulophidae) endoparasitoide encontrado en Togo por Borbón (1989). Entre estos parasitoides los betilidos ***C. stephanoderis*** y ***P. nasuta*** son los más aconsejables para ser incluídos en programas de manejo de la broca, básicamente por ser los que se pueden criar en condiciones de laboratorio.

En Colombia la broca se cría masivamente en laboratorios usando café pergamino con un contenido de humedad del 45%. Los granos infestados se mantienen en bandejas metálicas a 80% de HR y 27EC. A los pocos días los granos infestados muestran actividad alimenticia y al cabo de unos 20 días presentan suficientes estados inmaduros para la producción del parasitoide. El desarrollo de ***C. stephanoderis*** toma entre 18-21 días a 25EC en un cuarto oscuro. La emergencia de los parasitoides se logra proporcionando temperaturas más altas y luminosidad. Durante 1993 fue posible producir en Colombia, cerca de tres millones de parasitoides y en 1994 la eficiencia se incrementó y se logró producir cerca de seis millones de parasitoides por mes en tres unidades de producción. Hasta el momento (septiembre de 1998) se han liberado en diferentes regiones del país más de 1400 millones de parasitoides en fincas infestadas con broca y en las que no se hace uso de insecticidas, con el fin de asegurar su establecimiento.

C. stephanoderis se ha establecido en todos los lugares de Colombia donde se ha liberado, después de 5 años de liberados en cafetales en Nariño el parasitoide aún permanece activo en esta zona (Benavides *et al.* 1994, Quintero *et al.* 1998). Desde 1998 se inició un programa para liberación masiva de ***P. nasuta*** y a partir de 1999 el programa se extenderá con ***P. coffea***.

USO DE ENTOMOPATÓGENOS.

El hongo entomopatógeno ***Beauveria bassiana*** (**Bb**) se encuentra naturalmente infectando la broca en casi todas las regiones de Colombia donde la broca hace su aparición. Hasta el momento se poseen 102 aislamientos de **Bb** de diferentes países y colectados localmente, de los cuales aproximadamente la mitad han mostrado actividad contra broca.

Se estudió y desarrolló una técnica de bioensayo para seleccionar los aislamientos más patogénicos (González *et al.*, 1993). El ciclo de vida de **Bb** sobre la broca bajo condiciones de laboratorio, se completa en promedio en 8,2 días desde la inoculación del insecto con el hongo hasta el desprendimiento de las esporas. Estos resultados pueden variar de acuerdo con el aislamiento que se use y las condiciones de temperatura del laboratorio. Se ha demostrado también la importancia de pasar el hongo **Bb** a través de insectos para reactivar su patogenicidad. Cuando se cultiva el hongo en medios artificiales por tres o más generaciones su patogenicidad se reduce considerablemente, y el tiempo promedio para causar mortalidad en la mitad de la población se incrementa, en comparación con el hongo activado sobre broca (González *et al.*, 1993).

Los estudios con *Metarhizium anisopliae* (Bernal *et al.*, 1994) han mostrado que este hongo puede jugar un papel importante en el control de la broca en el suelo, al infectar la poblacion de brocas que emergen de los frutos brocados que han caído previamente al suelo.

PRODUCCION DE *B. bassiana*

Dos enfoques se han investigado para la producción de Bb, a nivel industrial y a nivel artesanal. A nivel industrial (Morales *et al.*, 1991), la tecnología se ha transferido a productores particulares para que se encarguen de la producción del hongo. En la actualidad existen cuatro compañías con licencia del ICA, que suministran hongo formulado para el control de la broca. Durante 1992 se utilizaron cinco toneladas de hongo a una concentración de 1×10^8 esporas/gramo con fines experimentales. La producción de **Bb** para el control de la broca del café fue de 60 toneladas en 1993 (Posada, 1993) y para 1998 se estimó en 300 toneladas de un producto conteniendo al menos 1×10^9 esporas / gramo de producto.

También se estudió una metodología para producir el hongo a nivel de caficultor en su finca (Antía *et al.*, 1992). La producción promedia de esporas en estas botellas es de 5×10^{10} esporas/100 g de sustrato a 25EC, después de un tiempo de desarrollo de 24 días. Una vez que el hongo completa su desarrollo está listo para ser usado por el agricultor. La producción de una botella es suficiente para asperjar 100 árboles a una dosis de 5×10^8 esporas/árbol. Cenicafé ha puesto a disposición del cafetero una Unidad de Producción Masiva del hongo ***B. bassiana***, para suministrar un inoculo puro para su reproducción. El hongo producido en esta unidas se le hace un control de calidad para asegurar: a) que esté libre de contaminantes; b) tenga la concentración apropiada; c) viabilidad del 100%; d) patogenicidad sobre broca en laboratorio superior al 80% y e) uso de una cepa del hongo recién activada y de mejor comportamiento en el campo.

Las formulaciones de ***B. bassiana*** se han evaluado bajo condiciones de campo y en todos los casos el hongo se ha establecido en las poblaciones de broca. **Bb** sólo es efectivo cuando la broca entra en contacto con las esporas, al tratar de penetrar la cereza. Si el insecto ya entró a la cereza es difícil que el hongo lo pueda afectar.

La epizootiología de **Bb** se estudió en una finca infestada con broca en Ansermanuevo (Valle del Cauca) a 1000 msnm en un cafetal de variedad Colombia plantado a una densidad de 10.000 árboles por hectárea (Bustillo *et al.*, 1991). La infestación de la broca se inició en la parte central de la parcela en junio de 1990 y en esa época se asperjó con una formulación en polvo de **Bb** en la dosis de 1×10^8 esporas/árbol. Después de seis meses la broca estaba distribuida en todo el campo así como el hongo. Se evaluó mensualmente la infestación de broca e infección por el hongo sobre 300 ramas tomadas aleatoriamente entre enero y agosto de 1991. La unidad de muestreo fue una rama productiva sobre la cual se contaron todas las cerezas, las cerezas infestadas y aquellas con infección del hongo. Los resultados indican que una alta proporción de la broca (> 75%) puede ser infectada por el hongo a medida que el tiempo transcurre causando una reducción en la población de la plaga.

Lista de enemigos encontrados atacando o compitiendo con la broca en Colombia

ENEMIGOS NATIVOS	ESTADO DE LA BROCA AFECTADO	ENEMIGOS NATIVOS	ESTADO DE LA BROCA AFECTADO
		PREDADORES	
ENTOMOPATOGENOS		Formicidae	
HONGOS		***Crematogaster*** sp.	Todos
Hyphomicetes		***Pheidole*** sp.	Todos
Beauveria bassiana	larva,pupa,adulto	***Brachymyrmex*** sp.	Todos
Beauveria brongniartii	adulto (lab.)	***Solenopsis*** sp.	Todos
Hirsutella eleutheratorum	adulto	***Wasmannia*** sp.	Todos
Metarhizium anisopliae	adulto	***?Prenolepsis*** sp.	Todos
Paecilomyces lilacinus	adulto	Anthocoridae	
		Calliodis sp.	inmaduros
BACTERIAS		***?Scoloposcelis*** sp	inmaduros
Bacillaceae			
Bacillus sp.	larva	COMPETIDORES	
Enterobacteriaceae		COMPETIDORES COMPETENCIA INTERESPECIFICA (Por espacio y/o alimento)	
Serratia sp.	larva		
PROTOZOARIOS		INSECTOS	
Microsporidia		Hormigas	en frutos del árbol y suelo
cercano a ***Mattesia***	adulto	Dipteros	en frutos del árbo
		Coleópterps	en frutos del árbo
PARASITOIDES			
Braconidae		HONGOS	en frutos del árbo
Cercano a ***Crytoxilos*** sp	adulto	BACTERIAS	en frutos del árbo
		NEMATODOS	en frutos del árbol y suelo

ENEMIGOS NATIVOS DE LA BROCA

En los predios en los cuales se ha hecho un uso racional o no se han asperjado insecticidas se ha desarrollado una fauna benéfica que está obrando sobre las poblaciones de broca. En diferentes zonas cafeteras de Colombia, se ha observado la presencia de varios enemigos nativos de la broca, especialmente en sitios en los cuales la broca lleva más de dos años y no se han utilizado insecticidas. Los reconocimientos de la disciplina de Entomología de **Cenicafé** llevados a cabo en diferentes zonas cafeteras del país han permitido elaborar la siguiente lista no sólo de enemigos de la broca sino de otros organismos que compiten por su nicho.

El anterior listado de factores de mortalidad de la broca, asociado con todos los organismos que están compitiendo por ocupar su sitio, especialmente en los frutos brocados, son responsables de que sus poblaciones se reduzcan con el tiempo, lo cual conduce a disminuir los costos de control. Las prácticas de control que se usen deben mantener el equilibrio biológico o sea la protección de la fauna benéfica. Las épocas lluviosas proporcionan humedad al suelo, fomentando así la invasión de microorganismos competidores dentro de los frutos brocados que caen al suelo.

El uso de insecticidas es contraindicado en estas condiciones porque no sólo afectan los controladores naturales de la broca, sino que eliminan la fauna benéfica de otros insectos como el minador, escamas, cochinillas, palomillas y defoliadores que no se convierten en plagas gracias al control que ejercen sus enemigos nativos.

MANEJO INTEGRADO DE LA BROCA

Debido a que la broca del café es una plaga introducida sin enemigos naturales presentes en Colombia, la primera estrategia basada en los resultados de investigación presentados aquí, fue introducir tanto parasitoides como entomopatógenos en el ecosistema cafetero que ha sido invadido por la broca (Bustillo, 1993) y preservar y fomentar la fauna benéfica nativa.

Luego se estructuró un programa de manejo integrado que incluye conocimiento en la finca sobre períodos de floraciones, evaluación de infestaciones, prácticas de cosecha sanitaria ("el RE-RE"), controles en la etapa de beneficio del café y los componentes biológicos baseados en

parasitoides como ***C. stephanoderis***, y entomopatógenos como ***B. bassiana*** (Bustillo, 1990). El uso de insecticidas se restringe a aquellos casos en que los niveles de infestación lo ameriten, especialmente en sitios donde la broca se encuentra agregada, para lo cual se recomiendan productos de baja toxicidad (categorías III y IV) y poco impacto ambiental. Las parcelas de manejo integrado que Cenicafé monitorea en fincas de cafeteros han mostrado la viabilidad de las recomendaciones para que el cafetero pueda seguir produciendo café tipo "Federación" en presencia de la broca.

CONCLUSIONES

El enfoque del manejo integrado de plagas es la mejor estrategia para el control de la broca del café, procurando que el control biológico sea uno de los componentes principales. En Colombia se han introducido y desarrollado agentes benéficos para ser utilizados en el control de esta plaga. El uso de los parasitoides ***C. stephanoderis*** y ***P. nasuta*** y del entomopatógeno ***B. bassiana,*** así como el fomento de la fauna nativa, en un programa de manejo integrado de la broca, es factible como lo demuestran las investigaciones realizadas en Colombia.

LITERATURA CITADA

ANTIA, O. P.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E.; GONZÁLEZ, M.T. 1992. Producción en finca del hongo ***Beauveria bassiana*** para el control de la broca del café. Cenicafé, Avances Técnicos No. 182, 8pp.

BENAVIDES, P.; BUSTILLO, A. E.; MONTOYA, E. C. 1994. Avances sobre el uso del parasitoide ***Cephalonomia stephanoderis*** para el control de la broca del café, ***Hypothenemus ampei***. Rev. Colombiana Ent., 20 (4):247-253.

BERNAL, M. G. ; BUSTILLO, A. E.; POSADA, F. J. 1994. Virulencia de aislamientos de ***Metarhizium anisopliae*** y su eficacia en campo sobre ***Hypothenemus hampei.*** Rev. Colombiana Ent. 20 (4):229-233.

BORBON, O. 1989. Bioecologie d' un ravageur des bajes de cafeier ***Hypothenemus hampei*** (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) et des ses parasitoides au togo. These du doctorat de L'Universite Paul-Sabatier de Toulouse Cedex, France. 185p.

BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V. ; SUCKLING, D.M. 1989. Endosulfan resistance in ***Hypothenemus hampei*** (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. J. Econ. Entomol. 82 (5):1312-1316.

BUSTILLO, A. E. 1990. Perspectivas de manejo integrado de la broca del café, ***Hypothenemus hampei*** en Colombia. Socolen, Medellín, Colombia, Miscelánea No.18, p.106-118.

BUSTILLO, A. E. 1993. El control biológico como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café, ***Hypothenemus hampei***, en Colombia. Memorias XX Congreso de Socolen, Cali,julio 13-16, 1993, p.159-164.

BUSTILLO, A. E.; CASTILLO, H.; VILLALBA, D.; MORALES E.; VELEZ, P. E. 1991. Evaluaciones de campo con el hongo ***Beauveria bassiana*** para el control de la broca del café, ***Hypothenemus hampei*** en Colombia. In: Colloque Scientifique International sur le café, 14. San Francisco. 14-19 juillet, Paris, ASIC. 679-686p.

GONZALEZ, M. T.; POSADA, F. J. ; BUSTILLO, A. E. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de ***Beauveria bassiana*** sobre ***Hypothenemus hampei***. Revista Cenicafé 44(3): 93-102.

LE PELLEY, R. H.1968. Pests of coffee. Longmans, Green and Co. Ltd., London.590 p.

MORALES, E.; CRUZ, F.; OCAMPO, A.; RIVERA, G. ; MORALES, B. 1991. Una aplicación de la biotecnología para el control de la broca del café. In: Colloque Scientifique International sur le café, 14. San Francisco. 14-19 juillet, Paris, ASIC. 521-526p.

POSADA, F. J. 1993. Control biológico de la broca del café, ***Hypothenemus hampei*** (Ferrari) con hongos. Memorias XX Congreso Socolen, Cali julio 13-16, 1993, p.137-151.

QUINTERO, C., BUSTILLO A. E., BENAVIDES, P., CHÁVES, B. 1998. Evidencias del establecimiento de *Cephalonomia stephanoderis* y *Prorops nasuta*, en cafetales del departamento de Nariño, Colombia. Manuscrito en prensa en Folia Entomológica Mexicana. 15p.

TICHELER, J. H. G. 1963. Estudio analítico de la epidemiología del escolítido de los granos de café, ***Stephanoderes hampei*** Ferr., en Costa de Marfil.(Traducción G. Quiceno). Revista Cenicafé 14 (4): 223-294.

CONTROL BIOLOGICO DE PLAGAS DEL CAFETO: PRODUCCION Y SECADO DE BIOPESTICIDAS EN FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO

S. Roussos[1], C. Bagnis[1], W. Rodriguez[2], M-A. Aquiahuatl[2], O. Besnard[3], R. Duponnois[4]

[1]Laboratoire de Microbiologie IRD, Université de Provence, CESB/ESIL, Case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France ; Email: roussos@esil.univ-mrs.fr
[2] Depto Biotecnologia ; UAM-Iztapalapa; AP 55-535; CP 09340 Mexico DF ; Mexico
[3] Société Mycos; Parc Scientifique Agropolis II; 34397 Montpellier Cedex 5; France
[4] Laboratoire de Biopedologie IRD ; BP 1386 ; Dakar ; Senegal Biological control of coffee pests : large scale production of fungal biopesticide in solid state fermentation

ABSTRACT

Over 400 species of fungi can control specific nematodes or insect pests. The concept of using fungal pathogens to control insects is by no means new; the first reports of mass production appeared in the nineteenth century. During the last 20 years, research has been stimulated by the increasing resistance of insects to chemical pesticides and by a greater public awareness of environmental impacts of chemicals. Recent success in using nematophagous and entomophagous fungi as biopesticides demonstrate a high potential for coffee production and possible commercial applications. The study of the sporulation physiology, allowed to define optimum media and environmental conditions to produce large quantities of conidiospores of Aspergillus niger, Beauveria bassiana, Poecelomyces fumosoroseus, and Trichoderma harzianum in bulk. Pilot plant scale production of conidiospores was conducted in solid state fermentation using two methods: disk fermentor and natural solid support (sugarcane bagasse) . In disk fermentor, optimal production of conidiospores was obtained after 6 days of incubation for T.harzianum, with an exceptionnally hihg yield of $3.5x10^{10}$ conidiospores per gram of substrate. In a column type reactor, T.harzianum yielded up to $1.1x10^{10}$ spores per gram of sugarcane bagasse. Conidiospore conservation was tested by refrigeration (4°C), freezing (-4°C) and drying (20 and 40°C). Best results were obtained by refrigeration and drying at 20°C. The kinetics of viability of refrigerated and dried conidiospores of T.harzianum showed the possibility of a reliable utilization of these strains with a 98% of viability, even after two months.We discuss the applicability of these methods to the major groups of fungi with actual or expected potential as biopesticide to control insects and nematodes causing economic damage in coffee production. Information about their physiology, spore production at a commercial scale, equipments and formulations is compiled.

RESUMEN

El estudio de la fisiología de esporulación, relacionado con la producción cuantitativa de conidiosporas, permitió definir las condiciones medio ambientales y optimizar la composición de los medios de cultivo para la producción masiva de conidiosporas de hongos filamentosos utilizados en lucha biologica (Beauveria bassiana, Trichoderma harzianum). B.bassiana es un hongo entomopatógeno que se utiliza contra los insectos como la broca del grano de café (Hypothenemus hampei). T.harzianum se utiliza como biopesticida en el control biológico de hongos fitopatógenos (Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani, Fusarium solani). Se estudió la producción de esporas a nivel laboratorio, a un nivel semi piloto en un esporulador de discos y a un nivel planta piloto en un fermentador estático tipo zymotis. Los rendimientos de esporulación de T.harzianum en Zymotis fueron de $5x10^{13}$ esporas, cantidad que nos permite tratar al menos una hectarea de cultivo. La conservación de las esporas se realizó por secado directo del producto fermentado en el bioreactor. Los mejores resultados se obtuvieron, introduciendo un flujo de aire seco de 3 litros por minuto durante 24 horas a una temperatura de 20°C. En estas condiciones se obtuvo un biopesticida con $5x10^{9}$ esporas por gramo de peso seco, que conservan una viabilidad de 98% despues de varias semanas. La misma técnica de producción y de secado de esporas en Fermentación en Medio Sólido (FMS) podría ser utilizada para otros hongos filamentosos entomopatógenos.

INTRODUCCION

Los cultivos de plantas tropicales son atacados por numerosas plagas debidas a insectos, nematodos, y microorganismos como las bacterias, virus y hongos fitopatógenos (**Tabla 1**).

Para el cafeto las principales enfermedades son debidas a hongos, insectos y nematodos (Müller et al. 1999). Estas plagas causan daños importantes y si no se controlan por tratamientos químicos o biológicos, la cosecha puede perderse.

El uso exclusivo de métodos convencionales para el control de enfermedades en plantas, ha originado problemas tales como desarrollo de resistencia a los productos químicos por parte de los patógenos, presencia de residuos de plaguicidas en los vegetales y acumulación de tóxicos en el ambiente (Lopez-Llorca, 1992).

Tabla 1: Número de plagas para algunos cultivos de plantas tropicales.

Plantas	Virus	Bacteria	Mohos	Insectos	Nematodos
Piña	2	3	3	4	3
Banana	4	2	5	1	1
Cacao	1	-	4	1	-
Café	-	-	2	3	2
Caña de azúcar	2	3	4	3	1
Algodón	2	1	4	3	1
Maiz	2	1	3	12	-

El uso exclusivo de métodos convencionales para el control de enfermedades en plantas, ha originado problemas tales como desarrollo de resistencia a los productos químicos por parte de los patógenos, presencia de residuos de plaguicidas en los vegetales y acumulación de tóxicos en el ambiente (Lopez-Llorca, 1992).

Esta situación, ha despertado el interés por el uso de métodos alternativos, basados en los antagonismos concurrentes en la naturaleza como parte de la cadena trófica. Asi, se ha identificado a los hongos filamentosos como el grupo de microorganismos mas importante en su actividad patógena hacia poblaciones de insectos, que destruyen cultivos de interés económico y como método de control biológico de nematodos patógenos de animales de granja o de plantas (Larsen, 1999, Leij, 1992, Duponnois et al. 1996). A procesos como este se les ha denominado lucha biológica y a los agentes microbiológicos involucrados se les conoce como biopesticidas. En general un biopesticida es un material biologicamente actívo, con actividad altamente específica contra insectos, nemátodos u otros microorganismos patógenos; biodegradable y no tóxico para insectos polinizadores. Los beneficios y los riesgos del uso de biopesticidas se han discutido durante una conferencia internacional que se llevó a cabo en Filandia en Marzo de 1992, entre las conclusiones de dicha reunion de expertos, su remarco que hay que dar más énfasis a los beneficios, sin dejar de lado los potenciales riesgos de esta tecnología (Hokkanen & Lynch, 1995).

Hongos entomopatógenos Para el control biologico

El conocimiento del ciclo vital del huesped tanto como el del hospedero, ha permitido seleccionar el estadio apropiado de ambos, para obtener los mejores resultados en la lucha biológica (Dufour et al. 1999). En el caso de los micoparásitos entomopatógenos, el proceso de infección inicia por la invasión del insecto a travez de la cuticula. Esta acción como mecanismo exterior, está influida por las condiciones ambientales y para poder asegurar la efectividad del biopesticida ahora se sabe que las esporas son la etapa reproductiva fungal de uso apropiada (Feng et al. 1994; Jenkins & Goettel, 1997). Los hongos superan a cualquier invertebrado en el control biológico, debido entre otras razones a que tienen un ciclo de vida corto que se traduce en un potencial alto de reproducción (multiplican su efecto por infecciones sucesivas) y en algunos casos son endoparásitos obligados de un huesped específico. Otra ventaja del uso de hongos en la lucha biológica es que estos pueden vivir como saprófitos en ausencia de sus huespedes (Scholler and Rubner, 1994) y en condiciones adversas producen esporas de resistencia, aumentando con esto su permanencia y efecto en el nicho que se les requiere; ademas, no son patógenos para otros organismos diferentes de sus huespedes.

Tabla 2: Algunos antagonistas de insectos que se utilizan como entomopatógenos en Control biológico.

Orden	**Insectos**	**Hongos Entomopatógenos**
	Género y Especie	**Antagonistas**
Ortoptera	*Schistocerca gregaria*	*Metarhizium anisopliae*
Dermaptera	*Forficula spp.*	*Entomophtora formicula*
Eteroptera	*Scotinophora*	*Beauveria bassiana*
Omoptera	*Trialeurodes*	*Aschersonia aleuridis*
Tisanoptera	*Thrips tabaci*	*Verticillium lecanii*
Coleoptera	*Hypothenemus hampei :* (la broca)	*Beauveria bassiana*

El uso de hongos patógenos para controlar insectos, es un concepto cuyos primeros reportes de producción masiva aparecieron en el siglo XIX.

Unos ejemplos de hongos entomopatógenos antagonistas de insectos se reportan en la **Tabla 2**. Los reportes de los últimos veinte años sobre el uso de hongos entomopatógenos y nematófagos como biopesticidas ofrece alternativas interesantes de uso de estos microorganismos en la agroindústria cafetalera, asi como de su explotación comercial (Bustillos, 1999; Dufour et al. 1999).

Fisiologia de esporulacion de los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se reproducen por multiplicación vegetativa (conidiogénesis) produciendo conidiosporas que se llaman conmunemente esporas. Los índices de esporulación (Ie) para un hongo, indican la cantidad de esporas producidas por gramo de substrato inicialmente presente en el medio de cultivo (Roussos 1985). Estos indices pueden cambiar según la fuente de carbono y la relación Carbono-Nitrógeno (C/N) de los medios de cultivo. El estudio de la fisiología de esporulación, en relación con la producción cuantitativa de conidiosporas de 5 cepas de hongos filamentosos (**Tabla 3**) permitio definir las condiciones medio ambientales y optimizar la composición de los medios de cultivo (Roussos y al. 1989). Se anota que los índices de esporulación son muy altos cuando la harina de yuca está utilizada como fuente de carbono y alcanzan valores de 7.2 x 10^9 para *Beauveria bassiana* y 1.4 x 10^{10} para *Trichoderma harzianum. T. harzianum es* un hongo filamentoso antagonístico que se utiliza como agente de biocontrol contra *Pythium ultimum* y otras enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos (Jensen & Wolffhechel, 1995). *B.bassiana* es un hongo entomopatógeno que se utiliza contra la broca de café (Bustillos, 1999; Dufour et al. 1999).

Tabla 3 : Esporulación de 5 cepas de hongos filamentosos cultivadas en matraces conteniendo un medio de cultivo con Papa Dextrosa Agar a 25°C.

Hongos filamentosos	**Indice de esporulación**	**Fuente de carbono**	**C/N**
Trichoderma harzianum	14.1 x 10^9	Harina de yuca	14
Aspergillus niger	5.2 x 10^9	Harina de yuca	24
Beauveria bassiana	7.2 x 10^9	Harina de yuca	24
Aspergillus terreus	9.9 x 10^9	Melaza	14
Penicillium roquefortii	7.2 x 10^9	Melaza	24

La producción de esporas para uso de laboratorio se hacen en condiciones esteriles utilizando matraces. Para una producción de esporas en mayores cantitades se utilizan otros tipos de reactores y estratégias de producción de inóculos ya se han desarrollado (Feng et al. 1994; Jenkins & Goettel 1997; Montero et al. 1989; Roussos et al. 1992).

producción de ESPORAS de hongos en medio Solido

El cultivo tradicional de los hongos en medio sólido se practica de manera industrial para la producción de hongos comestibles (*Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus*) y para la elaboración de alimentos fermentados como los quesos tipo roquefort o el Tempe, alimento obtenido por fermentación de granos cocidos de soya. La Fermentación en Medio Solido (FMS) es un nuevo proceso de cultivo de microorganismos sobre substratos naturales (salvado de trigo, bagazo de caña, pulpa de café, harina de yuca, granos de arroz) o sobre soportes sólidos previamente humidificados con una solución nutritiva (Raimbault et al. 1989; Viniegra-Gonzalez, 1997).

La FMS presenta una multitud de ventajas para la producción de enzimas, esporas y metabolitos de microorganismos (Roussos et al. 1997). En el último decenio, no ha habido a nivel mundial un desarrolo de explotación comercial tan evidente de la FMS como el que se ha dado en la investigación básica del mismo proceso. Una de las mayores razones para esta situación, es la falta de técnicas eficientes para la obtención de inóculos esporales activos, los cuales son requeridos en gran cantidad en los procesos de FMS. La forma, edad y proporción del inóculo son tambien de importancia crítica en los sistemas de FMS (Lonsane et al. 1992), los cuales requieren una cantidad grande de inóculo (2x10^{10} esporas/Kg de substrato seco). En los sistemas de FMS, comunmente se prefiere como inóculo las esporas al micelio vegetativo, por la facilidad de mezclado de estas, con los substratos sólidos humedecidos (Raimbault & Alazard, 1981).

Tabla 4 : Productividad de esporas de *Trichoderma harzianum* en diferentes bioreactores.

Bioreactor	Producción de conidiosporas	
	por gramo de harina de yuca	por cm^2 de la superficie de cultivo
Matraces Erlenmeyer	1.1×10^{10}	1.7×10^{8}
Fermentador de discos DI	9.3×10^{9}	2.2×10^{8}
Columna, 18 g materia humeda	5.0×10^{10}	$*8.8 \times 10^{8}$
Zymotis : Carga util de 21 Kg	5.0×10^{10}	$*7.7 \times 10^{8}$

* El resutado es por cm^3 de la supercicie de cultivo

Se conocen diferentes técnicas de FMS para la la producción de conidiosporas a nivel de planta piloto o industrial. Las mas antiguas se refieren al uso de botellas de Roux o de charolas (Vezina & Sing, 1975). En los últimos 20 años, se han reportado varios procesos nuevos de fermentación para la producción de propágulos de hongos filamentosos tanto en medio liquido como en medio sólido (Rombach et al. 1988; Feng et al. 1994; Jenkins & Goettel , 1997) y en fermentadores de discos (Raimbault & Roussos, 1985). En la **Tabla 4** se presenta la productividad de esporas de *T.harzianum* en diferentes bioreactores (Roussos et al. 1991). La producción de esporas de hongos filamentosos en bioreactores en FMS se lleva a cabo bajo condiciones controladas de esterilidad y seguridad de manejo y ofrece una multitud de ventajas: (1) uso de substratos agrícolas de bajo costo, (2) los bioreactores son de tamaño reducido, (3) el volumen de la aireación requerida de los medios de cultivo es muy baja (4) los substratos sólidos desarrollan una gran superficie libre de esporulación (5) la transferencia de oxígeno es muy eficiente, (6) la esporulación es muy rápida, eficiente y (7) las esporas producidas son de mejor calidad.

Conservación y secado de esporas de hongos filamentosos

La conservación de conidiosporas de hongos filamentosos para cepas de colección a nivel laboratorio se llevan a cabo mediante congelación (-18°C o -196°C en nitrógeno líquido) y secado en suelo estéril o liofilización. Estas técnicas de conservación son muy eficientes y se utilizan con éxito para mantener pequeñas cantidades de conidiosporas, pero el funcionamiento práctico en unos casos y el elevado costo del equipo en los otros, las hacen de uso limitado para escalas mayores. En la naturalezam las esporas de hongos filamentosos se conservan secas y la dispersión en el medio ambiente se hace por los vientos. Hay que mencionar que las esporas son formas de reproducción asexual de los hongos y se caracterizan por su resistencia a la sequía pero son lábiles a la temperatura y a la luz ultravioleta. Las esporas de *Trichoderma harzianum* se destruyen por un tratamiento térmico a 50°C por 30 min. (Roussos et al. 1989).

NUEVA TECNICA para la Produccion y secado de esporas de hongos en FMS

A continuación se presenta un ejemplo de producción y secado de esporas de *T.harzianun* por FMS para la obtención directa de un biopesticida. Una mezcla de bagazo de caña y de cascara de remolacha (80/20) se utilizó como substrato sólido. Este sustrado (1 Kg) fué humidificado con 1 Litro de agua potable; se homogeneizó por mezclado y se esterilizó en un autoclave a 110°C por una hora. Al substrato estéril, se anadieron 2 litros de una suspensión de esporas de *T.harzianum* conteniendo $2x10^{10}$ esporas. La inoculación homogénea del substrato sólido se obtuvo por mezclado.

Tabla 5 : Cinéticas de producción de esporas de *T. harzianum* cultivado sobre una mezcla de cascara de remolacha y de bagazo de caña (75/25). Viabilidad de las esporas antes y después del secado con aire seco a 20°C.

Incubación a 29°C (dias)	Humedad del substrato (%)		Producción de esporas (x 10^8 / g SPS)		Viabilidad de esporas (x 10^8 / g SPS)	
	Fresco	Secado	Antes	Despues Secado	Antes	Despues Secado
4	80.1	3.4	38.7	35.0	5.0	13.1
5	86.6	3.9	45.8	48.9	21.5	40.2
6	81.4	3.3	54.0	36.4	41.2	40.2
7	85.9	2.4	47.9	35.5	50.0	45.4

El substrato inoculado se ha repartido en 20 columnas de FMS (De Araujo et al. 1997) y estos bioreactores se incubaron a una temperatura de 29°C durante 8 días. Para favorecer la germinación del inóculo, en las primeras 10 horas de incubación no hubo aireación de las columnas. Para favorecer el crecimiento del microorganismo, los cultivos recibieron una aireación de 3 litros por hora y por columna con aire humedo a partir de la décima hora. Para secar el producto fermentado, despues de algunos dias de incubación (**Tabla 5**), las columnas FMS se

retiraron de la incubadora y recibieron un flujo de 3 litros por minuto de aire seco a 20°C durante 24 horas. La humedad de producto final fué menor al 4%.

Durante todo el tiempo de la incubación de los cultivos en 29°C bajo aireación con aire húmedo, la humedad del producto fermentado se mantuvo arriva del 80%. Estas condiciones favorecen la esporulación de *T.harzianum*. Después de 5 dias de incubación el hongo esporuló y la aparición de un color verde significa una esporulación abundante y homogénea. Por conteo al microscópio, se anotó que la esporulación fué importante y el índice de esporulación alcanzó $4.6x10^9$ esporas por gramo de substrato peso seco. Después de 5 días de incubación se cambió el flujo, de aire húmedo por el aire seco obtieniendose un producto estabilizado para conservarlo por un largo plazo (2 meses) sin perdida significativa de viabilidad. Esta misma técnica se aplicó con diferentes hongos filementosos (*Penicillium, Aspergillus*) y con diferentes mezclas de substrato (bagazo de caña , pulpa de café, salvado de trigo) con resultados muy semejantes.

CONCLUSIONES:

Para los hongos filamentosos, las esporas son las formas de reprodución, de dispersión y de sobrevivencia sobre todo en condiciones de baja actividad de agua. Los hongos filamentosos pueden crecer sobre substratos sólidos y producir cantidades elevadas de esporas (10^9 esporas por gramo de substrato seco). Aprovechando estas características de los hongos una técnica de producción y de secado de esporas en FMS se ha desarrollado para la producción de biopesticidas utilizando diferentes antagonistas. Varios microorganismos crecen y esporulan con altos rendimientos sobre un substrato sólido (bagazo de caña + cascara de remolacha) en condiciones de FMS. Para obtener una esporulación importante de un hongo antagonista, se debe optimizar tanto un medio nutritivo como un soporte solido que permita tanto el crecimiento y la esporulación como el secado del producto final. Esta situación facilita grandemente la conservación, la viabilidad y el transporte de los biopesticidas. De tal manera que se puede centralizar la producción de biopesticidas en un lugar lejano de la aplicación de los mismos, mejorando notablemente el control de la calidad, y la competitividad del producto.

REFERENCIAS

Bustillos A. 1999. El papel del control biológico en un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. Proceedings of III SIBAC , Londrina 24-28 May 1999, Brazil

De Araujo, A. A., Lepilleur, C., Delcourt, S., Colavitti, P. and Roussos S. 1997. Laboratory scale bioreactors for study fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegraz-Gonzalez, G. (Eds.), *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, p.93-111.

Dufour B., Barrera J.F., Decazy B. 1999. La Broca de los frutos del cafeto: La lucha biológica como solución. In Bertrand B & Rapidel B. (Eds) Desafios de la caficultura en Centroamérica. IICA.PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR.FRANCIA, San José, Costa Rica ch.9: 293-325

Duponnois R., Mateille T., Sene V./, Sawadogo A., Fargette M. 1996. Effect of different West African species and strains of *Arthrobotrys* nematophagus fungi on meloidogyne species. Entomophaga 41: 475-483.

Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Science and Technology 4: 3-34.

Hokkanen H.M.T., Lynch J.M. 1995. Biological control: Benefits and Risks. Plant and Microbial Biotechnology Research Series 4, University Press, Cambridge, 304 p.

Jenkins N.E., Goettel M.S. 1997. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers andv locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada 171: 37-48.

Jensen D.F., Wolffhechel H. 1995. The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and damping-off diseases. In Hokkanen H.M.T., Lynch J.M. (Eds), Biological control: Benefits and Risks. Plant and Microbial Biotechnology Research Series 4, University Press, Cambridge, p.177-189.

Larsen, M. 1999. Biological control of helmints. Int. J. Parasitol. 29(1): 139-146.

Leij F.D. 1992. The significance of ecology in the development of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent against root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) PhD Thesis, Univ.Wageningen, 140 p.

Lonsane, B.K., Saucedo-Castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Gildyal, N.P., Ramakrishna, M. and Krishnaiah, M.M. 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem.* 27: 259-273.

Lopez-Llorca L.V. 1992. Los hongos parásitos de invertebrados y su potencial como agentes de control biológico. Revista Iberoamericana de Micología 9: 17-22.

Montero, F.A., Roussos S., Olmos A. 1989. Producción de biopesticidas a nivel planta piloto para el uso en cultivo de café. *In* Roussos, S., Licona, F.R. and Gutierrez, R.M. (Eds.), *I Seminario Internacional de Biotecnología en la Indústria Cafetalera.*, Memorias I SIBAC, Xalapa, Veracruz, p. 199-202.

Müller R., Berry D., Bieysse D. 1999. La anthracnosis de los frutos : un grave peligro para la caficultura Centroamericana. In Bertrand B & Rapidel B. (Eds) Desafios de la caficultura en Centroamérica. IICA.PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR.FRANCIA, San José, Costa Rica ch.8: 261-291.

Raimbault, M. and Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 199-209.

Raimbault, M. and Roussos, S. 1985. Procédé de production de spores de champignons filamenteux. *Brevet Français* N° 85.08555.

Raimbault, M., Roussos, S., Oriol, E., Viniegra, G., Gutierrez, M., Barrios-Gonzalez, J. 1989. Procédé de culture de microorganismes sur milieu solide constitué d'un support solide, absorbant, compressible et non fermentable. *Brevet Français* N° 89. 06558.

Rivillas Osorio C.A., Leguizamon Caycedo J.E., Gil Vallejo L.F. 1999. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Cenicafé Boletin Técnico 19: 7-36.

Rombach M.C., Aguda R.M., Roberts D.W. 1988. Production of *Beauveria bassiana* in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. Entomophaga 33: 315-324.

Roussos, S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. *Thèse d'Etat*, Université de Provence, Marseille, 193 p.

Roussos, S., Aquiahuatl, M.A., Brizuela, M.A., Olmos, A., Rodriguez, W. and Viniegra, G. 1989. Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum for solid substrate fermentation. *Micol. Neotrop. Apl.* 2: 3-17.

Roussos, S., Olmos, A., Raimbault, M., Saucedo-Castañeda, G. and Lonsane, B.K. 1991. Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system : Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Tech.* 5: 415-420

Roussos, S., Raimbault, M., Prebois, J-P. and Lonsane, B.K. 1993. Zymotis, A large scale solid state fermenter : Design and evaluation. *Applied Biochem. Biotechnol.* 42: 37-52.

Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G. (Eds.), Advances in solid state fermentation, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 631 p.

Schoeller, M., Rubner, A. 1994. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol. Res.* 149: 145-149

Vezina, C. and K. Sing, 1975. Transformation of organic compounds by fungi spores. In: Smith, J.E. and D.R. Berry (Eds.). The filamentous fungi, I. Industrial Mycology. Edward Arnold, Londres.

Viniegra-Gonzalez G. 1997. Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G. (Eds.), *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Ch.2: 5-22.

THE NEMATOPHAGOUS FUNGI HELPER BACTERIA (NHB) : A NEW DIMENSION FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF ROOT KNOT NEMATODES BY TRAPPING FUNGI

R. Duponnois [1], J.L. Chotte [1], A.M. Bâ [2] and S. Roussos [3]

[1] IRD. Laboratoire de Biopédologie. BP 1386. Dakar. Sénégal - [2] ISRA/IRD. BP 1386. Dakar. Sénégal - [3] IRD. Laboratoire de Mycologie et des FMS (LAMY-FMS). IFR-BAEM; Université de Provence, CESB/ESIL, Case 925; 163 Avenue de Luminy. F-13288, Marseille Cedex 9 FRANCE

SUMMARY

The research work presented in this paper summaries the studies performed in the Biopedology laboratory of IRD Dakar on the biological control with nematophagous fungi against the root-knot nematodes. The results show that the fungi can act against M. incognita and M. mayaguensis, the most infective species in West Africa but also frequently detected through coffee plantations. They can also control the development of Meloidogyne populations on tomato plants. A cultural practice has been developped using compost blocks in which the fungus was inoculated. In a field experiment, the growth of tomato plants has been increased while the nematode development has been decreased. However, all these experiments have been performed during a short period. In order to enhance the competitivity of the fungus, the fungus can be associated with bacterial isolates, called NHB (Nematophagous Helper Bacteria), which stimulate the fungal activity against Meloidogyne but involve also a depressive effect on other plant parasitic nematodes such as Rotylenchulus reniformis.

INTRODUCTION

Many genera and species of plant parasitic nematodes are associated with coffee in the world being therefore responsible for great financial losses to the coffee farmers. Among these pathogens, root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) are the most abundant group (Table 1) and the most common species are M. exigua, M. incognita and M. coffeicola. The symptoms of damage due to these pathogens are typical rounded galls on the root systems, white to yellowish brown becoming dark brown in aging roots. The infested coffee plants show foliar chlorosis, leaf fall, general decline. Their growth is generally reduced and sometimes the plants died (Hutton et al., 1982 ; Lordello, 1984). The coffee plantations can be dramatically affected by the nematodes. For example, in Sao Paulo state (Brazil), they have been destroyed by M. incognita with 5-year-old coffee plantations dying out (Lordello, 1984).

The control of nematodes is more difficult in a perennial crop than in annual or herbaceous crops. For example, the rotation schemes, successfully used with annual crops, are impractible with these long term cultures. Moreover surviving roots of excised plants or old plants left in the field can provide nutrients for nematodes and consequently maintain the nematodes population in the soil.

The control practices used by many farmers is generally based on (i) the production of seedlings without root-knot nematodes (i.e. disinfection of nursery soils), (ii) the application of nematicides and/or the culture of resistant or tolerant cultivars. Among these control measures, pesticide compounds are mostly applied to reduce nematode multiplication.

Table 1. Nematophagous fungi used in the experiments

Identification	Code	Geographical origin	Author
Arthrobotrys oligospora	S 30	Burkina Faso	Sawadogo A. (1)
Arthrobotrys oligospora	S 31	Burkina Faso	Sawadogo A.
Arthrobotrys conoides	S 42	Burkina Faso	Sawadogo A.
Arthrobotrys sp.	BF 10	Burkina Faso	Sawadogo A.
Arthrobotrys sp.	BF 74	Burkina Faso	Sawadogo A.
Arthrobotrys sp.	BF 80	Burkina Faso	Sawadogo A.
Arthrobotrys sp.	SOSU 2	Burkina Faso	Sawadogo A.
Arthrobotrys sp.	ORS 18690 S2	Senegal	R. Duponnois
Arthrobotrys oligospora	ORS 18692 S5	Senegal	R. Duponnois
Arthrobotrys oligospora	ORS 18692 S7	Senegal	R. Duponnois

(1) INERA, Protection des Végétaux, BP 403, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

However they are very expensive and very toxic when improperly. Thus other control techniques such as biological control have been investigated. Besides various microorganisms tested against Meloidogyne spp. such as arbuscular mycorrhizae (Hussey & Roncadori, 1982), eggs parasitic fungi (Verticillium chlamydosporium)(Kerry, 1990 ; Bourne et al., 1994), rhizobacteria (Racke & Sikora, 1986) and fungal endophytes (Schuster et al., 1995), research focused on nematophagous fungi (Cayrol , 1983 ; Pelagatti et al., 1986 ; Duponnois et al., 1996). The screening of efficient fungal strains against Meloidogyne was based on the use of tests performed in axenic or controlled conditions (in vitro tests or glasshouse experiments with desinfected substrates). When these microorganisms were transferred into the field, their antagonistic activity was often modulated (generally decreased) by the environmental conditions. In fact, the topics of this kind of research must integrated the requested qualities of the fungal strain but also its repply from interactions with the soil microbial community in the soil. In the laboratory of biopedology (IRD, Dakar), we have developped a scientific program based on (i) the screening of efficient fungal strains for trapping juveniles of Meloidogyne, (ii) the determination of potential effects of rhizobacteria on in vitro growth and nematode-trapping activity of Arthrobotrys oligospora, population development of plant parasitic nematodes and (iii) develop a control method with the fungal strain incorporated into compost blocks. Tobacco and tomato plants, very susceptible to Meloidogyne, were used in these experiments.

MATERIALS & METHODS

1/ Test of the potential of nematophagous fungi against Meloidogyne

A collection of nematophagous fungi isolated from several vegetable-producing areas in Senegal and Burkina Faso were maintained aseptically in the dark at 25°C on the nutrient broth (8 $g.l^{-1}$) agar (20 $g.l^{-1}$) medium (Table 1). The trapping activity of each fungal strain was estimated using technique described by Duponnois et al. (1996). Populations of different species of Meloidogyne (M. mayaguensis, M. javanica and M. incognita) were reared on tomato (Lycopersicon esculentum Mill.), cv Roma roots. Two months after inoculation, the roots were harvested, cut into short pieces and placed in a mist chamber for one week for egg hatching (Seinhorst, 1950). Fungal agar plugs were taken from the margin of two week old colonies and transferred into Petri dishes filled with distilled water agar (20 $g.l^{-1}$). One week later, 100 second stage juveniles suspended in a water droplet were placed on these fungal cultures. After two days, the number of juveniles trapped by the fungus were counted under a dissecting microscope. Each combination Meloidogyne species-fungal isolate was replicated five times. The trapping rate (trapped juveniles / total juveniles) was transformed by arcsin(sqrt) and treated with a one way analysis of variance, the mean values being compared with the Student's t-test at 0.05 probability level.

The ability of these fungal strains to control Meloidogyne populations was examined through a glasshouse experiment. Solid fungus inocula were prepared in 0.5 dm^3 glass flasks containing 0.3 dm^3 compost. After autoclaving at 120°C for 40 min, the substrate was moistened to field capacity with liquid nutrient broth medium (8 $g.l^{-1}$), the jars closed with cotton wool and autoclaved a second time at 120°C for 20 min. After cooling, mycelial plugs, sampling from each fungal cultures on Petri dishes, were put into each glass flasks. The cultures were incubated for 5 weeks at 25°C.

The fungal inoculum was mixed to an autoclaved (140°C, 40 min) sandy soil (pH H_2O 7.1 ; fine silt 0.6% ; coarse silt 1.4% ; fine sand 61.6%) at the rate 1 : 100 (v :v). This mixture was divided in 60 cm^3 polythene cells (The control treatment received the same quantity of compost but without fungus). Then a one week old tomato seedling was transferred into each cell. After 1 week, the tomato plants were inoculated with 5 ml suspension of 100 7-day-old second stage juveniles of M. mayaguensis (water alone for the control). The cells were placed in a glasshouse under natural climatic conditions (temperatures from 20°C to 35°C ; about 15 hours light per day). The treatments were watered daily and arranged in a randomized complete block design with 14 replicates. One month after the nematode inoculation, the plants were uprooted and the roots washed. Shoots were dried at 65°C for one week and weighed. Galls induced by M. mayaguensis were counted. Then roots were cut into 1 to 2 cm pieces and placed in a mist chamber for 2 weeks to recover hatched juveniles (Seinhorst, 1950). Roots were then oven-dried and weighed. The data were treated with an one way analysis of variance and the mean values were compared with the Student's t test

($P < 0.05$). For nematodes, data were previously transformed by log (x+1). 2/ Study of the potential effects of **rhizobacteria** on the antagonistic activity of Arthrobotrys oligospora against Meloidogyne spp.

The basis of this research program have been described in Duponnois & Bâ (1998). The authors have demonstrated that a large nematophagous fungus population was associated with the presence of bacteria belonging to the group of Pseudomonas fluorescent. Furthermore, the aims of this research were to test the effect of these bacteria on the fungal growth (a strain of A. oligospora T41), on its predatory activity and to evaluate the bacterial influence on the fungal control of the multiplication of Meloidogyne population.

Bacterial strains were cultured in Petri dishes on 0.3% TSB agar medium at 25°C for two days. The bacterial cultures were suspended in 5 ml of sterile magnesium sulfate solution (0.1 M) with a bend glass rod. The control treatment was prepared in the same way from a Petri dish containing the same agar medium without bacteria. One set of experiment was performed by direct liquid contact between the mycelium and the bacteria. Fungal plugs sampled as described above were dipped in the bacterial suspensions or in the control solution for 1-2 min and transferred into empty Petri dishes (Duponnois & Garbaye, 1990). Another set of expriment was done with no liquid contact. Two-compartment dishes were used: the fungal plugs were laid on the dry bottom of the dish for one compartment while the other was filled by 0.3% TSB agar medium inoculated or not (control treatment) by the bacterial strains.The gas diffusion from one side to the other was permitted because the wall separating the two compartments did not touch the lid of the dish.

In both experiment types, two dishes, each with 3 mycelial plugs, were prepared for each treatment. Then the dishes were incubated at 25°C for four days. Observation and numeration were carried out through the lid with a stereomicroscope and the mean radial growth in two perpendicular direction was calculated. The data were statistically compared to the control treatments without bacteria with the Student "t" test ($P<0.05$).

The fungal plugs, dipped in the bacterial suspensions or control treatment as described above, were transferred to Petri dishes filled with distilled water agar (20 $g.l^{-1}$). There were five replicates per treatment. The Petri dishes were incubated at 25 °C in the dark. Two weeks later, 100 7-day-old-second stage J2 of Meloidogyne mayaguensis suspended in 100 µl sterile distilled water were placed on the fungal cultures. Populations of M. mayaguensis were reared on tomato (Lycopersicon esculentum Mill.), cv. Roma. Two months after inoculation, roots were cut into 2-3 cm pieces and placed in a mist chamber for one week to allow nematode eggs to hatch and the juveniles to be collected (J2) (Seinhorst, 1950). After 48 hours, the number of the juveniles trapped by the fungus were counted. The data were statistically treated as described above.

Tobacco (Nicotiana tabacum L. var. Paraguay x Claro) seedlings were grown in 60 ml polythene pots filled with an autoclaved soil (140 °C, 40 min) sandy soil (clay : 3.9 %; silt : 2.9%; sand : 92.2 %; carbon : 3.7 %; nitrogen : 0.45 %; pH(H_2O) : 8.3) inoculated with 1 mg dry weight of fungal biomass and/or 5 ml of each bacterial suspension (about 10^{12} colony forming unit $(cfu).ml^{-1}$). The fungal strain had been grown in one litre glass flask filled with 0.5 litre of 0.3% TSB medium for 2 weeks at 25 °C. The fungal suspension was then filtered and the mycelium was collected. The fungal mycelium was three times washed in $MgSO_4$ 0.1 M and finally suspended in $MgSO_4$ 0.1 M. The bacterial isolates were cultured in 3 $g.l^{-1}$ liquid Difco tryptic soy broth in glass flasks shaken for 8 days at 25 °C. The bacterial suspensions were then centrifuged (2400 g, 10 min) and the pellet resuspended in $MgSO_4$ 0.1 M. The control treatments were performed by injecting in the soil 1 ml of $MgSO_4$ 0.1 M without either fungus or bacteria. There were ten replicates per treatment.

After 2 month culture, 10 tobacco plants from each treatment were transferred in 10 litre pots filled with the same soil as above but non autoclaved. The pots were placed in a glasshouse under natural conditions (temperatures ranged from 20°C to 35°C ; about 15 hours light per 24 h). After two month culture, the plants were harvested and the root systems gently washed. The soil from each pot was mixed, a 250 g sub-sample was taken and the nematodes were extracted by the Seinhorst's (1962) elutriation technique. The oven-dried weight of shoot (one week at 65°C) was measured. Each root system was then cut into 2-3 cm pieces and placed in a mist chamber for two weeks in order to recover nematodes (Seinhorst, 1950). The nematodes were counted

under a stereomicroscope (magnification x 150). The means of treatment vs. control (not inoculated) were compared with Student's 't' test at 0.05 probability level. For the nematode populations, data were transformed by log (x + 1) prior to analysis.

3/ Development of a control method with the fungal strain incorporated into compost blocks

The fungal inoculum (strain ORS 18692S7) was prepared using the compost as describe in the section 1/. Then it was diluted with the same compost (without fungus) at the concentration 1 : 100 (v : v). This substrate was used to make small blocks (4 x 4 x 4 cm^3) with a mechanical apparatus (F.A.O. patent). Each block received a tomato seedling which was cultured during 3 weeks in a glasshouse. The blocks with the seedlings were then transferred to the plots (2.5 x 2.5 m ; 25 plants per plot, 0.5 apart) separated from one another by 2 m. The treatments were arranged in a randomised complete block design with 10 replicates. The control treatment consisted of blocks without fungus. This experiment was conducted from May to July (maximal temperature < 35°C) on the same soil as that used in the section 1/. The height, the mortality, the shoot and root biomass were determined after two month culture. Every month, from transplanting to the end of the experiment, one tomato plant was uprooted from each plot. The nematodes were extracted from the roots as described above. A 250 g sample of the soil surrounding the plant was sampled in each plot and the nematodes were extracted (Seinhorst, 1962). The data were treated with a one way analysis of variance and the mean values were compared with the Student's t test ($P < 0.05$). For nematodes, data were previously transformed by log(x+1).

RESULTS

The juveniles of M. mayaguensis were trapped by all the fungal strains (Table 2). The higher rates were recorded with ORS 18692 S7, S 30, S 31 and S 42. The higher trapping activities against M. incognita were observed with S 30, S 31 and S 42. On the opposite, M. javanica juveniles were only affected by the fungal strain S 31.

The growth of tomato plants was significantly increased when the strains ORS 18690 S2, ORS 18692 S7 and S42 have been inoculated (Table 3). The fungal isolate S31 has only stimulated the root development. The numbers of juveniles of M. mayaguensis per plant were significantly lower in the fungal treatments than in the control. The same effect was observed with the gall indexes excepted with ORS 18692 S7 (Table 3).

The fungal growth was increased by 7 bacterial isolates (S22, S51, S73, G10, G33, G36 and SG9 when bacteria were testing for direct trophic effect (liquid contac)(Table 4). Only 3 bacterial isolates have improved the fungal growth when the microorganisms were confrontated by a gaseous way. Seven bacterial isolates (S51, S109, G36, G93, G95, SG8 and SG9) enhanced the predatory activity of the fungus T 41 on M. mayaguensis (Table 4).

Table 2. Predatory activity (expressed as % of trapped Meloidogyne spp. juveniles) of the fungal isolates against 3 species of Meloidogyne in axenic conditions

Fungal isolates	M. mayaguensis	M. incognita	M. javanica
ORS 18690 S2	11 c (1)	0	0
ORS 18692 S5	26 b	3 b	0
ORS 18692 S7	74 a	0	0
S 30	78 a	65 a	0
S 31	82 a	70 a	20
S 42	82 a	60 a	0
BF 10	10 c	4 b	0
BF 74	9 c	2 b	0
BF 80	14 c	2 b	0
SOSU 2	8 c	16 b	0

(1) data in the same column followed by the same letter did not significantly differ according to the one way anlysis of variance ($P < 0.05$)

Table 3. Effect of the fungal isolates on the growth of tomato plants infested with 100 juveniles of M. mayaguensis per plant and on the development of the nematode

Fungal strains	Shoot biomass (mg dry weight)	Root biomass (mg dry weight)	Number of gallsper plant	Number of juveniles per plant
Control	23.1 b [1]	101 b	21.3 a	7046 a
ORS 18690 S2	31.3 a	194 a	15.4 b	4008 b
ORS 18692 S7	31.3 a	184 a	18.3 ab	2112 b
S 31	22.3 b	174 a	13.6 b	3611 b
S 42	31.9 a	163 a	14.4 b	2470 b
BF 10	21.7 b	109 b	12.7 b	2527 b
SOSU 2	22.9 b	140 ab	12.4 b	2132 b

[1] data in the same column followed by the same letter did not significantly differ according to the one way analysis of variance ($P < 0.05$)

Table 4. In vitro effect of fluorescent Pseudomonas on the radial growth (direct and gazeous confrontation) and predacious activity of Arthrobotrys sp. T41. *: significantly different from the control according to Student's t-test ($P<0.05$). **: significantly different from the control according to the Student's t-test ($P<0.01$)

Bacterial treatments	Radial growth (mm) Direct confrontation	Radial growth (mm) Gazeous confrontation	Predacious activity (%) (trapped J2s/total J2s)
Control	63,5	13,8	45,2
S22	69,9 **	16,8	56,9
S51	69,2 **	15,5	60,0 *
S73	67,0 *	19,0 **	55,4
S109	65,8	16,5	78,6 *
G10	66,2 *	16,1	39,4
G12	63,8	16,3	46,9
G33	67,0 **	18,0 *	37,4
G36	69,4 **	17,9 *	59,0 *
G93	65,1	16,0	75,0 *
G95	61,9	17,3	61,3 *
SG1	65,4	17,4	58,3
SG8	66,2	17,3	72,9 *
SG9	66,5 *	17,1	81,7 *
SG12	63,8	16,3	37,3
SG18	62,7	14,1	35,4
SG19	61,9	14,1	41,9

The two main plant-parasitic nematodes genus identified in the tobacco root systems and in the soil were Meloidogyne spp. and Rotylenchulus reniformis (Table 5). No effect of the fungus A. oligospora T41 on Meloidogyne has been recorded (Table 5). Only 2 bacterial isolates (G93 and SG19), inoculated without T41, have significantly inhibited the multiplication of the root-knot nematodes. However, when the dual inoculation (T41 + bacterial strain) was performed, the number of juveniles per plant has been significantly decreased in the treatments with G10, G36 and G95. The multiplication of R. reniformis has been inhibited in the bacterial treatment S73 (Table 5). When the fungus was added, an inhibition of the nematode development has been recorded in all the treatments (Table 5) excepted in the treatment SG18 + T41.

At the end of the field experiment (2 months), the fungal treatment was responsible for a significant increase in the height, shoot and root biomasses of the tomato plants and a significant decrease of the mortality (Table 6). Moreover the number of juveniles of Meloidogyne per gram of root biomass and per dm^3 of soil was significantly greater in the control than in the treatment with ORS 18692 S7 (Fig. 1).

Table 5. Effect of the bacterial strains on the number of juveniles of Meloidogyne spp. and Rotylenchulus reniformis per tocacco plants inoculated or not with the nematophagous fungus Arthrobotrys sp. T41. * : significantly different from the control (not inoculated treatment) according to the Student's t test ($P < 0.05$). ND : Not Determined.

Bacterial strains	Meloidogyne spp.		Rotylenchulus reniformis	
	Bacteria alone	Bacteria + T41	Bacteria alone	Bacteria + T41
Control(without bacteria)	98944	90080	79452	41950 *
S22	186820	75890	54200 *	20780 *
S51	33410	35650	118240	ND
S73	23674	194411	35790 *	43270 *
S109	71720	104180	70040	29840 *
G10	67010	23000 *	75280	31320 *
G12	48343	49655	98630	21350 *
G33	57660	74562	65700	41137 *
G36	75370	12740 *	80790	43530 *
G93	14806 *	84212	43526 *	39925 *
G95	68740	7250 *	86131	47310 *
SG1	63700	89990	73160	26010 *
SG8	147072	101551	59050 *	29670 *
SG9	59640	146770	43730 *	28670 *
SG12	48138	57910	69826	37400 *
SG18	35140	50140	51890 *	75160
SG19	7640 *	103643	42710 *	44070 *

Table 6. Effect of Arthrobotrys oligospora ORS 18692 S7 on height, mortality, average shoot and root biomass of tomato plants in the field experiment after 2 month culture. [(1)] : for each parameter, data in the same lign followed by the same letter did not significantly differ according the one way analysis of variance ($P < 0.05$).

Parameters	Compost blocks without fungus	Compost blocksWith fungus
Height (cm)[(1)]	23.2 b	31.8 a
Mortality (%)	36.8 a	16.4 b
Shoot biomass (g dry weight per plant)	7.1 b	12.6 a
Root biomass (g dry weight per plant)	0.7 b	1.8 a

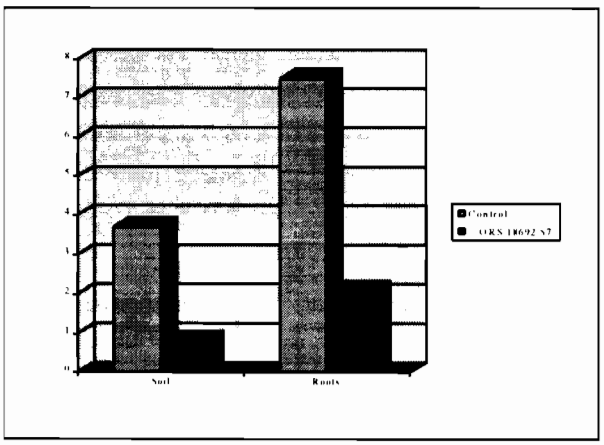


Fig. 1. Effects of the nematophagous fungus ORS 18692 S7 on the multiplication of Meloidogyne spp. juveniles in tomato roots and in the soil. For each parameter (root and soil), the columns indexed with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$). The data of the nematode population in the soil are expressed as x 100, in the roots, the numbers are calculated per g of dry weight of root biomass and divided by 10^5.

DISCUSSION

The different fungal isolates of Arthrobotrys from Senegal and Burkina Faso were able to trap the juveniles of M. mayaguensis and M. incognita. All these fungi could be good candidates for biological control in coffe plantations as M. incognita has occured for many years in separate or mixed populations (with M. exigua, M. coffeicola). Moreover the fungal isolates can act against M. mayaguensis. This very damaging Meloidogyne species has spread throughout

vegetable-producing areas in West Africa and is now present under various agro-climatic conditions (Mateille et al., 1994).

In the glasshouse experiment, the fungi had a great influence on the growth of tomato plants in spite of a low rate of inoculation (1 : 100, v :v). Compared to the concentrations commonly used in the controlled ectomycorrhization (1 : 10, v :v)(Duponnois & Garbaye, 1991), these results suggest that the nematophagous fungi have a great capacity to colonize the soil and consequently trapped the juveniles before infecting the roots. The decrease of the number of galls per plant in the fungal treatments shows this physiological advantage. Moreover these fungi can also use phytoparasitic nematodes as an energy source and it can be assessed that more larger is the nematode population, more important will be the fungal development.

However all these experiments have been performed in controlled conditions and during a short period (about one month). It is well known that the efficacy of these fungi strongly interact with environmental factors such moisture, pH, temperature and organic matter (Mosse, 1972). Recent researches have shown that the biological activities of soil microorganisms can be enhanced by some rhizosphere bacteria such as fluorescent Pseudomonas (Duponnois et al., 1993 ; Mateille & Duponnois, 1996). The results presented in this paper focussed on the great interactions between this group of bacteria and the nematophagous fungus. These bacterial isolates have been called NHB (Nematophagous Helper Bacteria)(Duponnois et al., 1998). From a practical point of view, it is generally assessed that the production of spores and mycelial biomass by nematophagous fungi is very limited (Cayrol, 1988). Moreover, the use of NHB can decrease the quantities of fungal inoculum added to the soil because of their benefical effect on the saprophytic growth and the predacious activities of the fungal strains. These NHB can also enlarge the effect of this practice on other pathogenic microorganisms such as Rotylenchulus reniformis which is also a widespread plant parasitic nematodes. As we have demonstrated that the compost blocks can be a good cultural support for the biological control against nematodes with nematophagous fungi, it is easly possible to add together the fungus and a selected bacterial strain inside the block. This new concept of the biological control could integrated the properties of the fungus and those from the bacteria (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, etc) and their beneficial interactions. However, the mechanisms involved between these two types of microorganisms must be elucidated in order to increase the efficiency of this dual inoculation.

REFERENCES

Bourne, J.M., Kerry, B.R. & De Leij, F.A.A.M. (1994). Methods for the study of Verticillium chlamydosporum in the rhizosphere. J. Nematol., 26 : 587-591.

Cayrol , J.C. (1983). Lutte biologique contre les Meloidogyne au moyen d'Arthrobotrys irregularis. Revue Nématol., 6 : 265-273.

Cayrol, J.C. (1988). Lutte biologique contre les Meloidogyne au moyen d'Arthrobotrys irregularis.Bull. OEPP, 18 : 73-75.

Duponnois, R & Bâ, A.M. (1998). Influence of the microbial community of a sahel soil on the interactions between Meloidogyne javanica and Pasteuria penetrans. Nematologica, 44 : 331-343.

Duponnois, R & Garbaye, J. (1990). Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria.Canadian Journal of Botany, 68, 2148-2152.

Duponnois, R. & Garbaye, J. (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-Laccaria laccata symbiosis : effects in vitro and in glasshouse conditions. Annales des Sciences Forestières, 48, 239-251.

Duponnois, R., Garbaye, J., Bouchard, D. and Churin, J.L. (1993). The fungus-specificity of mycorrhization helper bacteria (MHBs) used as an alternative to soil fumigation for ectomycorrhizal inoculation of bare-root Douglas-fir planting stocks with Laccaria laccata.Plant & Soil , 157 : 257-262.

Duponnois, R., Sene, V., Sawadogo, A., Fargette, M. & Mateille, T. (1996). Effects of different species and strains of the nematophagous fungus Arthrobotrys sp. from West Africa on Meloidogyne species. Technology transfer in biological control : from research to practice. IOBC/OILB. Montpellier.

Hussey, R. & Roncadori, R.W. (1982). Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. Pl. Dis., 6: 9-14.

Hutton, D.G., Eason-Heath, S.A.E. & Coates-Beckford, P.L. (1982). Control of Meloidogyne incognita affecting coffee. In : Proceedings of the third Research & Conference on Root-Knot Nematodes Meloidogyne spp., January 11-15, Region I : 109-113.

Kerry, B.R. (1990). An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. J. Nematol., 22 : 621-631.

Lordello, L.G.E. (1984). Nematoides das plantas cultivadas. 8° Ediçao. Livraria Nobel S.A. 314 p.

Mateille, T. & Duponnois, R. (1996). Organismes auxiliaires de la lutte contre les nématodes phytoparasites. Applications aux cultures maraîchères. Séminaire national sur la protection des cultures et des stocks dans une agriculture régénératrice. Thiès, Sénégal, 27-29 Mars 1996.

Mosse, B. (1972). The influence of soil type and Endogone strain on the growth of mycorrhizal plants in phosphate defficient soils. Revue Ecol. Biol. Soil, 10 : 529-537.

Pelagatti, O., Nencetti, V. & Caroppo, S. (1986). Utilizzazione del formulato R350 a based i Arthrobotrys irregularis nel controllo di Meloidogyne incognita. Redia, 89 : 276-283.

Racke, J. & Sikora, R.A. (1986). Influence of rhizobacteria on Globodera pallida early root infection and Erwinia carotovora tuber soft rot of potato. Revue Nematol., 9 : 305. (Abstract).

Schuster, R.P., Amin, N. & Sikora, R.A. (1995). Utilization of fungal endophytes for the biological control of Radopholus similis on banana. Nematologica, 41 : 342. (Abstract).

Seinhorst, J.W. (1950). De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aanstasting door het stengelaaltje Ditylenchus dipsaci Kühn Filipjev.- Tijdschrift over Plantenziekten, 56, 292-349.

Seinhorst, J.W. (1962). Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. - Nematologica, 8, 117-128.

LOS INHIBIDORES DE AMILASAS COMO ALTERNATIVA EN LA PRODUCCION DE CAFE RESISTENTE A LA BROCA,

Arnubio Valencia Jiménez [1] , María T. González [2] y Alex E. Bustillo P [2].

[1] Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas-Colombia
[2] Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. AA N°2427. Manizales-Colombia.

JUSTIFICACIÓN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), es sin lugar a dudas el problema fitosanitario de mayor importancia económica para la caficultura colombiana dado que ataca el fruto desde los primeros estados de desarrollo hasta estados próximos a la cosecha, ocasionando considerables pérdidas tanto en la producción como en la calidad del grano. El control que se recomienda para esta plaga en Colombia, ha considerado la estrategia de manejo integrado de la broca (MIB) con el fin de disminuir el daño y los niveles poblacionales del insecto. Dentro de las medidas se considera el control químico; el uso de parasitoides como: *Prorops nasuta* Waterston (Bethylidae) y *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Bethylidae), entomopatógenos como: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, el control cultural a través de recolecciones frecuentes de frutos maduros y el desarrollo de plantas resistentes a esta plaga.

Existen varias alternativas para el desarrollo de variedades resistentes a una plaga en particular, inicialmente, se deben identificar las fuentes de resistencia al insecto específico, mediante la exploración del germoplasma y de los parentales cercanos de la especie. El conocimiento de la biología del insecto, y la influencia de los factores bióticos y abióticos sobre la biología de éste, especialmente, hábitos alimenticios, oviposición, movimiento, parámetros de crecimiento y fecundidad, fundamentan el conocimiento detallado de la naturaleza intrínseca de la plaga a través de la exploración de las rutas metabólicas y fisiológicas que puedan ser blanco de inhibición (**Figura 1**). Así mismo, el aparato digestivo de los insectos y muy especialmente sus enzimas digestivas como proteasas y amilasas se constituyen en uno de los puntos más susceptibles en la fisiología de estos, dado que esta ruta metabólica es la única forma de aprovisionamiento energético del insecto.

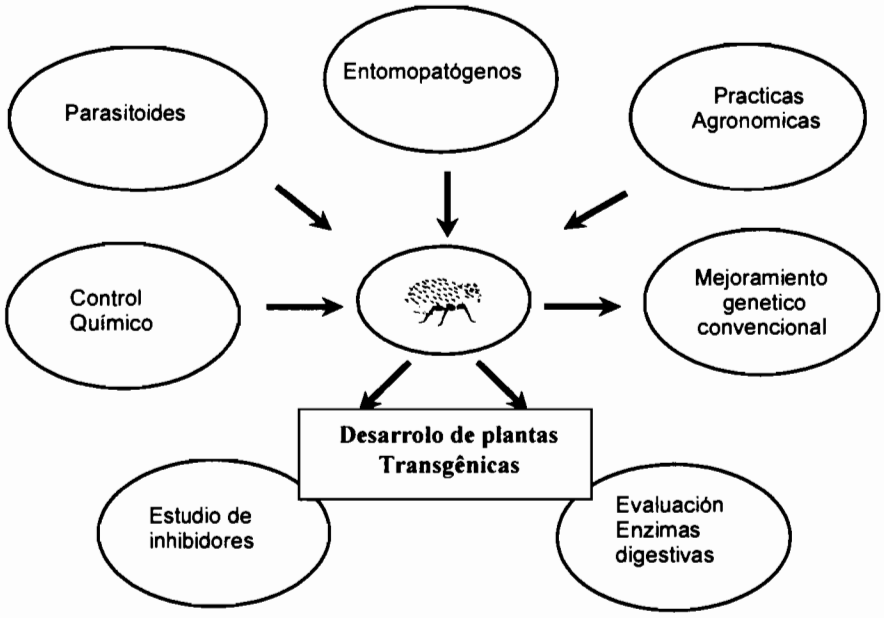


Figura 1. Estrategia de manejo integrado de *Hypothenemus hampei*

El problema de la broca, amerita que seconsideren investigaciones tendientes a explorar tras vías como el estudio de los mecanismos de resistencia al ataque de broca y más específicamente el uso de compuestos antimetabólicos de ocurrencia natural. Algunos de estos compuestos corresponden a los inhibidores de enzimas digestivas del insecto, tales como inhibidores de proteasas y amilasas los cuales tienen un enorme potencial para ser incluidos dentro de programas de mejoramiento genético a través de la biotecnología.

El desarrollo de variedades transgénicas de café con resistencia a broca, contribuirá de manera significativa a la reducción en el uso de agroquímicos los cuales por demás no proveen de una protección total, a la vez que el uso indiscriminado de estos puede conducir a la aparición de resistencia en el insecto como consecuencia de la alta presión de selección. Esta metodología adicionalmente conlleva a la reducción de costos en el manejo de la plaga, a la eliminación de residuos tóxicos en los productos alimenticios, a la conservación de la salud y protección del medio ambiente.

ANTECEDENTES

Por varios años las investigaciones se han dirigido al estudio de la regulación y biosíntesis de compuestos específicos asociados con los mecanismos de defensa de plantas al ataque de insectos y patógenos. Estos compuestos fueron considerados como desecho del metabolismo secundario de las plantas con funciones desconocidas. Sin embargo, actualmente se sabe que muchos de estos compuestos actúan solos o en conjunto jugando un papel en la resistencia de plantas al ataque de insectos y patógenos (Ryan, 1990). Entre esos metabolitos (**Tabla 1**), se incluyen lectinas (Chrispeels y Raikhel, 1991; Huesing *et al.*, 1991), ceras (Eigenbrode et al., 1991), fenoles (Summers y Felton, 1994), aminoácidos (Rosenthal y Dahlman, 1991; Rosenthal *et al.*,1989), azúcares (Juvik *et al.*,1994; Liedl *et al.*,1995), inhibidores de amilasas (Huesing *et al.*, 1991; Shade *et al.*, 1994) e inhibidores de proteinasas (Burgess *et al.*, 1994; Orr *et al.*, 1994; Wolfson y Murdock, 1995; Ryan 1973,1990; Boulter *et al.*,1990). Estos compuestos químicos han proporcionado diversos sistemas para el estudio de mecanismos de defensa inducible en plantas. En muchas plantas pueden sintetizarse en respuesta al ataque de plagas o patógenos generando señales intra o intercelulares que activan genes que codifican para su síntesis (Ryan, 1990).

La mayoría de los inhibidores se han encontrado en grandes concentraciones en semillas o tubérculos de algunas plantas, especialmente en gramíneas y leguminosas (Ryan, 1990; Green y Ryan, 1972) y se han aislado a partir de frijol mungo (Baumgartner *et al.*, 1976; Kapur *et al.*, 1989), centeno y trigo (Chang y Tsen, 1981; Gatehouse *et al.*,1986; Deponte *et al.*, 1976), guandúl (Godbole *et al.*, 1994b), papa (Eddy *et al.*, 1980; Ishikawa *et al.*, 1994; Orr *et al*, 1994), cowpea (Gatehouse *et al.*,1980; Hilder *et al.*,1989) tabaco (Geoffroy, 1990), amaranto (Rodriguez *et al.*,1993), tomate (Walker y Ryan, 1977), arveja (Domoney *et al.*, 1993), garbanzo (Mulimani *et al.*, 1994) maíz (Blanco e Iturbe-Chiñas, 1981) entre otros. Los inhibidores de proteinasas y amilasas se producen en los tejidos vegetales en diferentes proporciones. Generalmente, son proteínas con pesos moleculares por debajo de 50Kd y en algunas ocasiones por debajo de 20Kd (Boisen y Djurtoft, 1981; Chang y Tsen,1981; Gatehouse *et al.*,1980; Geoffroy *et al.*,1990; Godbole *et al.*,1994a; Rodriguez *et al.*,1993; Domoney *et al.*,1993; Blanco e Iturbe-Chiñas,1981; Weselake *et al.*,1983; Garcia-carreño *et al.*, 1993) presentándose en forma de dímeros o tetrámeros. Muchos inhibidores son producto de familias multigénicas y no es muy común encontrar isoinhibidores expresando diferente especificidad hacia proteasas (Ryan, 1990).

Papel fisiológico de los inhibidores de amilasas

El papel fisiológico de los inhibidores de amilasas en las plantas es desconocido (Gatehouse *et al.*, 1986). Existen evidencias que indican que pueden actuar como reserva proteica en las semillas; sin embargo, los inhibidores no afectan generalmente amilasas endógenas excepto en muy pocos casos. La especificidad de los inhibidores de amilasas y proteasas sobre las enzimas en estudio son bien conocidas, es así como el inhibidor de amilasas H-28 mostró actividad inhibitoria muy específica para las amilasas de insectos y ninguna actividad inhibitoria para amilasas de fuentes vegetales, fúngicas y animales incluyendo una amilasa de saliva humana. Se conocen además, muchos ejemplos en donde los inhibidores de amilasas y proteinasas, particularmente aquellos aislados de cereales, han mostrado inhibición de las amilasas del intestino de insectos (Burgess *et al.*,1994; Jhonston *et al.*, 1993. Christeller y Shaw, 1989; Chagolla *et al.*,1994; Grant *et al.*, 1995; Shade *et al*, 1994; Weselake *et al.*,1983), lo cual ha conducido a proponer que los inhibidores de enzimas digestivas juegan un papel protectivo contra

insectos predadores.Durante el ataque de un insecto a un órgano vegetal se desencadena la producción de compuestos altamente volátiles como los jasmonatos y metil jasmonatos, los cuales se transportan por el aire a otros órganos dentro o fuera de la planta y una vez allí dan inicio a una serie de reacciones bioquímicas que conducen a la síntesis de compuestos que confieren resistencia al ataque de insectos. Dentro de estos compuestos de Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) mediados por moléculas señal
como los jasmonatos y metil jasmonatos; se encuentran los alcaloides y muy especialmente los inhibidores de proteasas (Enyedi *et al.*, 1992).

Efecto de los inhibidores sobre la fisiología digestiva de los insectos

Cuando los inhibidores se encuentran presentes en grandes concentraciones en el alimento, pueden alterar significativamente varios procesos fisiológicos y digestivos interfiriendo con el normal crecimiento y desarrollo de los insectos. Los inhibidores de amilasas y proteasas no son un problema directo para los humanos dado que los alimentos que los contienen en grandes proporciones son sometidos a procesos de cocción utilizando altas temperaturas lo cual conduce a su inactivación (Ryan, 1990).

Varios efetos fisiológicos se manifiestan en el insecto como consecuencia de la ingestión de estos inhibidores (**Tabla 1**), dentro de los cuales se destaca el efecto antinutricional, la hipersecreción de enzimas, la pérdida de apetito y la eventual muerte.

Un mejor conocimiento de la regulación de la fisiología digestiva de los insectos y de los efectos reales de los inhibidores de proteasas y amilasas sobre estos procesos permitirá conocer el potencial de dichos inhibidores en los sistemas y mecanismos de defensa natural de las plantas.

Evaluación de la actividad biológica de inhibidores

En general existen varias vías que pueden ser usadas para evaluar la actividad biológica de inhibidores contra insectos herbívoros. La forma más directa mide la capacidad de un inhibidor para inhibir *in vitro* la actividad enzimática proveniente del intestino de un organismo blanco (Hatekeyama *et al.*,1992; Kang y Fuchs, 1973). El procedimiento involucra la extracción de las enzimas del intestino medio del insecto, su incubación con el inhibidor y el análisis de su actividad (Valencia *et al.*, 1994). Esta prueba conduce a la determinación de la clase de enzima presente en el intestino medio del insecto (Dionysius *et al.*,1993; Houseman y Thie, 1993) y establece el grado de unión entre la enzima y el inhibidor. Sin embargo, esta metodología no siempre
indicará que el insecto responda fisiológicamente al tratamiento (Broadway, 1995a).

Otra forma para evidenciar la respuesta de un organismo al tratamiento con inhibidores, consiste en incorporar los inhibidores a las dietas artificiales y evaluar la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo del insecto (Broadway, 1995b; Burgess *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1993; Orr *et al.*,1994; Gatehouse *et al.*, 1986; Steffens *et al.*,1978; Lipke *et al.*, 1954). Adicionalmente, se puede evaluar a nivel de planta la respuesta del insecto a la presencia de inhibidores (Broadway, 1995c; Green y Ryan, 1972; Hilder *et al.*,1987; Shade *et al.*, 1994; Schmidt, 1994).

Tabla 1. Efectos fisiológicos causados en los insectos como consecuencia del consumo de inhibidores.

Efectos fisiológicos de los inhibidores de enzimas digestivas sobre los insectos
Inhibición de la muda (Gatehouse *et al.*, 1992)
Hipertrofia pancreática (Liener, 1980)
Efecto antinutricional (Broadway, 1989; Houseman *et al*, 1989)
Reducción en fecundidad (Spats and Harris, 1984)
Hiperproducción de enzimas digestivas (Ryan, 1990)
Inhibición de proteolisis (Ryan, 1990)
Disminución en % de sobrevivencia (Johnston *et al.*, 1993; Broadway, 1995b)

Transformación genética

La primera transformación de una planta con un gen para inhibidor de proteasas fue desarrollada por Hilder *et al.*,1987. El gen para el inhibidor de Tripsina de Cowpea (*Vigna unguiculata*) (CpTI) fue transgénicamente insertado en plantas de tabaco las cuales mostraron mayor resistencia al ataque de *Heliothis virescens* que plantas sin la presencia del gen que codificaba para el inhibidor (**Figura 2**).

Esta proteina de Cowpea fue considerada como una fuente valiosa para ser transferida a otras especies vegetales por medio de la ingenieria genética por varias razones: Es un efectivo antimetabólito contra un gran número de insectos plagas de los ordenes Coleoptera, Orthoptera y Lepidoptera, sin efectos deletéreos sobre mamíferos y es además una proteina pequeña con un peso de 80 Kd (Gatehouse *et al.*, 1992).

La transformación genética de plantas a través de la expresión de inhibidores de enzimas digestivas de insectos, ha sido usada por otros grupos de investigadores en cultivos de importancia económica demostrando el potencial de estos como mecanismo de resistencia al ataque de insectos herbivoros (**Tabla 2**). Entre ellas, se incluyen: arveja (Schmidt, 1994; Shade *et al.*,1994), alfalfa (Thomas *et al.*,1994), tabaco (Hilder *et al.*,1987) y tomate (Graham *et al.*, 1986) entre otros.

Figura 2. Plantas de tabaco transgénicas expresando CpTI (Tomado de Gatehouse *et al.*, 1992)

Tabla 2. Plantas transgénicas que expresan inhibidores de amilasa y/o proteasas.

Planta	Tipo de inhibidor expresado	Referencia
Nicotiana tabacum	Inhibidor de Tripsina de Cowpea (CpTI)	Hilder *et al.*, 1987
	Inhibidor I de tomate	Gatehouse *et al.*, 1992
	Inhibidor II de tomate	Johnson *et al* , 1989
	Inhibidor II de papa	Gatehouse *et al.*, 1992
Pisum sativum	Inhibidor de *Alfa* amilasa (AI-Pv)	Shade, 1994
Medicago sativa	Inhibidor de Proteinasa	Thomas *et al.*, 1994
Gossypium hirsutum	Inhibidor de Tripsina de Cowpea (CpTI)	Woodend, 1994

Tabla 3. Desarrollo del gorgojo de arveja (*Bruchus pisorum*) en semillas T_5 de seis plantas de arveja transgénica (F_{10}).

Plantas	No. de semillas		No. de semillas infestadas		No. De semillas infestadas con emergencia de	
	T_5	Control	T_5	Control	T_5	Control
1	50	38	27	26	0	23
2	45	44	42	35	0	32
3	50	42	30	35	0	30
4	48	46	35	30	0	25
5	0	35	26	27	0	21
6	46	39	29	28	0	26
Total	279	244	189	181	0	157

Fuente: Schroeder *et al., 1995*

Expresión de estas proteínas en plantas transgénicas ha mostrado la perdurabilidad a través de sucesivas generaciones de la especie vegetal como en el caso de arveja transgénica (**Tabla 3**) mostrando la estabilidad genética de la planta transformada.

La manipulación genética de plantas como parte de un programa de mejoramiento puede tener una contribución significativa en la producción de plantas resistentes a insectos; transfiriendo únicamente el gen seleccionado y acortando el tiempo de producción de nuevas variedades. Así mismo, esta metodología ofrece muchas ventajas sobre el uso exclusivo de agroquímicos (Gatehouse *et al.*, 1992) tales como:

1. Provee larga protección;
2. Los insectos son afectados en su estado más sensible;
3. La protección es independiente de factores como el clima;
4. Protege tejidos vegetales de difícil acceso a los insecticidas;
5. Los efectos están restringidos al insecto plaga
6. No afecta el medio ambiente, son biodegradables y sin toxicidad al hombre y animales entre otros.

Teniendo en cuenta la especificidad de estos inhibidores (Richardson, 1977), sobre las enzimas digestivas del insecto se consideran excelentes marcadores para incluirlos en programas de mejoramiento genético conducente a buscar su expresión en los tejidos vegetales susceptibles al ataque de plagas o patógenos (Gatehouse *et al.*,1992). En conclusión las plantas producen diversas proteínas capaces de inhibir una enzima en particular, lo cual les confiere resistencia al ataque de insectos herbívoros. Esta investigación, pretende analizar cuidadosamente el potencial de los inhibidores de amilasas y proteasas de insectos como alternativa en el manejo integrado de la broca, *Hypothenemus hampei*. Para ello se hace necesario abordar la purificación y caracterización tanto de las enzimas digestivas presentes en el intestino medio del insecto como la de inhibidores para estas enzimas. De igual forma y teniendo en cuenta que los resultados en pruebas enzimáticas *in vitro* no siempre corresponden a los encontrados en pruebas de campo con material transgénico, se pretende incluir estos inhibidores en la dieta merídica para la cría de la broca de forma que la información generada a lo largo del proyecto permita seleccionar inhibidores de enzimas digestivas de la broca que puedan ser utilizados en un futuro no muy lejano, en la producción de café transgénico. Así mismo, se generará un mejor conocimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos y el grado de interacción con las enzimas en estudio.

LITERATURA CITADA

BAUMGARNERT, B. ; CHRISPEELS, J. M. Partial characterization of a protease inhibitor, which inhibits the major BLANCO-LABRA, A. ; ITURBE-CHIÑAS, F. A. Purification and Characterization of an alfa-amilase inhibitors from mize (*Zea maize*). Journal of Food Biochemistry. 5:1-17.1981.

BOISEN, S. ; DJURTOFT, R. Trypsin inhibitor from Rye endosperm: Purification and properties. Cereal Chemistry. 58(3) 194-198. 1981

BOULTER, D.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, A. V. Genetic engineering of plants for insect resistance. Endeavour (Inglaterra). New series.14: 85-190. 1990.

BROADWAY, M.R. Characterization and ecological implications of midgut proteolytic activity in larval *Pieris rapae* and *Trichoplusia ni*. Journal of Chemistry Ecology. 15:2101-2113. 1989.

BROADWAY, M. R. Potential use of natural products as resistance factors against herbivorous insects. Symposium Cornell University, August 1995b (mimeografiado) 3p.

BROADWAY, M. R. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. From Entomological Society of America Conference: Recent advances in the nutritional physiology of herbivorous insects. 1995a. (Mimeografiado) 29p.

BROADWAY, M. R. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? Journal of Insect Physiology. 41(2): 107-116.1995c.

BURGESS, E. P. J.; MAIN, C. A.; STEVENS, P. S.; CHRISTELLER, J. T. GATEHOUSE, A. M. R.; LAING, W. A. Effects of protease inhibitor concentration and combination on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. Journal Insect Physiology. 40(9): 803-811. 1994.

CHAGOLLA, L. A.; BLANCO, L. A.; PATTY, A., SANCHEZ, R; PONGOR, S. A novel α-amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacs*) seeds. The Journal of Biological Chemistry. 269(38): 23675-23680. 1994.

CHANG, C. R.; TSEN, C. C. Isolation of trypsin inhibitors from Rye, Triticale, and Wheat samples. Cereal Chemistry. 58(3) 207-210.1981.

CHRISPEELS, J. M.; RAIKHEL, V. N. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. The Plant Cell. 3, 1-9.1991.

CHRISTELLER, J. T.; SHAW B. D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bobine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. Insect Biochemistry. 19(3): 233-241.1989.

DEPONTE, R.; PARLAMENTI, R.; PETRUCCI, T.; SILANO, V.; TOMASI, M. Albumin α-amylase inhibitor families from wheat flour. Cereal Chemistry.53, 805-820. 1976.

DIONYSIUS, A. D.; HOEK, S. K.; MILNE, M. J.; SLATTERY, L. S. Trypsin-like enzyme from sand crab (*Portunus pelagicus*) purification and characterization. Journal of Food Science. 58(4): 780-784.1993.

DOMONEY,C.;WELHAM,T.; SIDEBOTTOM, C. Purification and characterization of Pisum seed trypsin inhibitors. Journal of Experimental Botany. 44(261): 701-709.1993.

EDDY, L. J.; DERR, E. J. ; HASS, G. M. Chymotrypsin inhibitor from potatoes interaction with target enzymes. Phytochemistry. 19:757-761. 1980.

EIGENBRODE, S. D.; STONER, K. A.; SHELTON, A. M. ; KAIN, W. C. Characteristics of glossy leaf waxes associated with resistance to diamondback moth (Lepidoptera :Plutellidae) in *Brassica oleracea*. Journal of Economic Entomology. 84:1609-1618. 1991.

ENYEDI, A. J.; YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. Cell (70): 879-886. 1992.

GARCIA-CARREÑO, F. L.; DIMES, L. E.; HAARD, F. N. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceus proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry. 214: 65-69. 1993.

GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. A.; BOULTER, D. Plant genetic manipulation for crop protection. Wallingford (England) CAB International, 1992. 266 p. (Biotechnology in Agriculture). No 7.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, A. J.; BOULTER, D. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*). Phytochemistry. 19:751-756.1980.

GATEHOUSE, A. M. R.; FENTON, A. K.; JEPSON, I. .; PAVEY, J. D. The effects of α amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of α amylase in vitro and effects on development in vivo. Journal of the Science of Food and Agriculture. 37:27-734. 1986.

GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. Molecular Plant-Microbe Interactions. 3(5): 327-333. 1990.

GODBOLE, A. S.; KRISHNA, G. T.; BHATIA, R. C. Changes in protease inhibitory activity from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.)(Millsp) during seed development and germination. Journal of the Science of Food and Agriculture. 66,497-501. 1994b.

GODBOLE, A. S.; KRISHNA, G. T.; BHATIA, R. C. Purification and characterization of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture. 64: 87-93. 1994a.

GRAHAM, S. J.; HALL, G.; PEARCE, G.; RYAN, A.C. Regulation of Synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. Planta 169:399-405. 1986.

GRANT,G.; EDWARDS, E. J.; PUSZTAI, A. α-amylase inhibitor levels in seeds generally available in Europe. Journal of the Science of Food and Agriculture. 67:235-238. 1995.

GREEN, R. T.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. Science.175: 776-777. 1972.

HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; YAMASAKI, N. A microassay for proteases using succinylcasein as a substrate. Analytical Biochemistry. 204: 181-184. 1992.

HILDER, A. V.;GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, E. S.; BARKER, F. R.; BOULTER, D. A. Novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature. 330: 160-163. 1987.

HILDER, V. A., BARKER F. R., SAMOUR A. R. GATEHOUSE M. R. A., GATEHOUSE A. J. ; BOULTER D. Protein and cDNA sequences of Bowman-Birk protease inhibitors from the cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.) Plant Molecular Biology. 13:701-710. 1989.

HOUSEMAN, J. G.; THIE N. M. R. Difference in digestive proteolysis in the stored maize beetles: *Sitophylus zeamais* (Coleoptera:Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Economic Entomology. 86(4): 1049-1054.1993.

HOUSEMAN, J.G.; DOWNE, A.E.R.; PHILOGENE, B.J. R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn-borer *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera:Pyralidae) Canadian Journal Zoological. 67(4):864-868. 1989.

HUESING, E. J.; SHADE, E. R.; CHRISPEELS, J. M.; MURDOCK, L. L. α-Amilase inhibitor, not pyotohemagglutinin explains resistance of common bean seeds to cowpea weevill. Plant Physiology. 96: 993-996.1991.

JOHNSTON, K. A.; GATEHOUSE, J. A.; ANSTEE, J. H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. Journal of Insect Physiology. 39(8):657-664. 1993.

JUVIK, J. A.; SHAPIRO, J. A.; YOUNG, T. E.; MUTSCHLER, M. A. Acylglucoses from wild tomatoes alter behavior and reduce growth and survival of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) Journal of Economic Entomology. 87:482-492. 1994.

KANG, S.; FUCHS, M. S. An improvement in the hummel chymotrypsin assay. Analytical Biochemistry. 54: 262-265. 1973.

LIENER, I.E.; KAKADE, M.L. Protease inhibitors. In Toxic constituents of plant foodstuffs, ed. I.E. Liener,pp 7-71. New York: Academic. 1980.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G. S. ; LIENER, I. E. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2: 410-415. 1954.

LIEDL, B. E.; LAWSON, D. M.; WHITE, K. K; SHAPIRO, J, A.; COHEN, D. E.; CARSON, W. E.; TRUMBLE, J .T .; MUTSCHLER, M. A. Acylsugars of wild tomato *Lycopersicum pennellii* alters setling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyroedidae) Journal of Economic Entomology. 88:742-748.1995.

MULIMANI, V. H.; RUDRAPPA, G.; SUPRIYA, D. Alfa-Amilase Inhibitors in chick pea (*Cicer arietinum L*). Journal of the Science of Food and Agriculture. 64: 413-415,1994.

ORR, L. G.; STRICKLAND, A. J.; WALSH, T. A. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. Journal of Insect Physiology. 40(10):893-900.1994.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plant and micro-organisms. Phytochemistry 16:159-169. 1977.

RODRIGUEZ, S. V.; SEGURA, N. M.; CHAGOLLA, L. A.; VERVER, A.; CORTINA, V.; MARTINEZ, G. N.; BLANCO L. A. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. Plant Physiology. 103: 1407-1412. 1993.

ROSENTHAL, G. A.; DHALMAN, D. L. Incorporation of L-canavanine into proteins and the expression of its antimetabolic effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39:987-990. 1991.

RYAN, C. A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Annual Review of Plant Physiology. 24:173-196. 1973.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review of Phytopatology. 28:425-449. 1990.

SCHROEDER, E. H. ;GOLLASCH, S.; MOORE, A.; TABE, L.A.; CRAIG, S.; HARDIE.D.C; CHRISPEELS, M.J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J. Bean alfa amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.) Plant Physiology. 107:1233-1239. 1995.

SHADE, E. R.; SCHROEDER, E. H.;PUEYO, J. J.; TABE, M. L.; MURDOCK, L. L.; HIGGINS, V. T. J.; CHRISPEELS, J. M. Transgenic pea seeds expressing the α-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Biotechnology. 12:793-796. 1994.

SCHMIDT, K. Genetic engineering yields first pest-resistant seeds. Science. 265: 739. 1994.

SPATS, G.E.; HARRIS, R.L. Reduction of fecundity, egg hatch and survival in adult horn flies fed protease inhibitors. Southwest. Entomology. 4:399-413. 1984.

STEFFENS, R.; FOX, R. F. ; KASSELL, B. Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner).Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26(1):170-174. 1978.

Resist

DUPLA AÇÃO

CARGA MÁXIMA PARA O SEU CAFÉ.

- Produto de alta eficácia no controle do complexo de doenças no café: **Ferrugem, Cercospora** e **Ascochyta**
- Vigor e produtividade promovidos pelo Cyproconazole.
- Maior retenção foliar devido ao Cobre.
- Compatível com inseticidas e adubos foliares (Sulfato de Zinco) na 1ª aplicação.
- Dose: 2,5 a 3,0 Kg/ha
- Intervalo de aplicação: de 60 a 75 dias.

ATENÇÃO

Este produto é perigoso à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Leia atentamente e siga rigorosamente as instruções contidas no rótulo na bula e receita. Utilize sempre os equipamentos de proteção individual. Nunca permita a utilização do produto por menores de idade.

Consulte sempre um engenheiro agrônomo.

Venda sob receituário agronômico.

ANDEF

O EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL É A SUA SEGURANÇA

RESIST® - Classificado pelo MS como produto pertencente à Classe Toxicológica II (Altamente Tóxico - Faixa Amarela), e pelo IBAMA como produto de Classe de Periculosidade Ambiental Muito Perigoso. Produto registrado no MA sob o nº: 03598. Marca registrada da Novartis, Basiléia, Suíça.

Emergências: Plantão Novartis 24 Horas: Tel.: (0__24) 358.8581.

NOVARTIS

Visite a nossa homepage: www.novartis.com.br

RESIST 000164FU IM09.2000

ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PRODUÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZEOS

Álvaro Alberto De Araújo[1] & Sevastianos Roussos[2]

[2]IRD (anciennement ORSTOM) - Institut de la Recherche pour le Développement, Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, CESB/ESIL Case 925. 163, Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 9. FRANCE [1] Bolsista CNPq/Brasília - BRASIL

Palavras chaves: Fungo, crescimento apical, *Pisolithus*, *Suillus*, fisiologia, meio agar

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a fisiologia de fungos ectomicorrízeos tais como Suillus e Pisolithus, cultivados em meio agar. Os objetivos principais são: produção de pré-inóculo para a micorrização de plantas jovens e desenvolvimento de técnicas para o tratamento das amostras possibilitando analisar o consumo de açúcar, produção de enzimas e biomassa produzida. Numa primeira etapa, verificou-se a influência da temperatura, do pH e de sais de magnésio no crescimento apical dos fungos ectomicorrízeos. Em seguida, desenvolveu-se uma técnica para o tratamento das amostras em meio agar, utilizando uma película de celofane onde pode se analisar separadamente o meio agar da biomassa (fungo que cresceu sobre a película de celofane). Esta técnica permite, entre outros, avaliar o consumo de glucose com o crescimento do fungo, a produção de enzimas e a quantidade de biomasa produzida. Estas técnicas assim como o cultivo/produção de fungos micorrízeos podem ser aplicadas para o caso das endomicorrízas do café.

Neste trabalho, apresentamos uma técnica para o estudo de parâmetros de crescimento de fungos sobre meio agar. Placas de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo 10 ml de meio de cultura sobre o qual se depositou um disco de papel celofane fim de permitir a separação fácil do micélio após crescimento. Para a análise da produção de biomassa fúngica, um disco de papel celofane previamente estéril, é depositado sobre a superfície do meio de cultura nas placas de Petri. A inoculação é realizada colocando-se um pedaço de micélio no centro do disco de celofane e as culturas são incubadas à 25°C na obscuridade. O crescimento radial da colônia é medido e a biomassa (peso seco) produzida é determinada. Ao meio de cultura, 90 ml de água destilada é adicionada e tudo é homogeneizado com a ajuda do Potter (Bioblock Scientific) para as análises de açúcares redutores e pH. O consumo de açúcar, variação do pH e produção de biomassa após 5, 10 e 15 dias de incubação à 25 °C para as linhagens de Suillus collinitus e Pisosithus tinctorius em diferentes meios de cultura (PDA, BAF, MNM, MP, GM8, MG) são mostrados neste trabalho. Esta técnica esta bem adaptada às culturas dos fungos e permite avaliar o consumo de açúcar e nitrogênio, os perfis de pH, a produção de biomassa, enzimas e pigmentos.

INTRODUÇÃO

Microorganismos estão presentes em grande quantidade junto às raízes de plantas, e eles possuem um papel importante em inúmeros processos fisiológicos. Pelmont (1) afirma que estes processos dinâmicos são mediados por associações de microorganismos participantes nas atividades das raízes tais como a fixação de nitrogênio e a mobilização do fósforo. Mousain (2,5) e Strullu (3) afirmam que as associações simbióticas predominantes nas raízes das plantas são de origem bacterial como *Rhizobium* ou de origem fúngica no caso das micorrizas. Marx and Cordell (4) definiram as micorrizas como união estável baseada em trocas recíprocas entre as raízes das plantas e os fungos, cada um otimizando seu desenvolvimento graças a essa associação. Mousain *et al.* (5) relataram que fungos ectomicorrízeos tais como *Lactarius* Pers., *Pisolithus* Alb. & Schwein., e *Suillus* P. Karst., são considerados como microorganismos fundamentais para a melhora qualitativa das árvores nos programas de reflorestamento.

De Araújo *et al.* (6) estudaram o efeito do meio de cultura, do pH inicial, e da concentração de sais no crescimento apical de quatro fungos ectomicorrízeos, mas pouca informação sobre a produção de biomassa fúngica e seus metabólitos são encontrados na literatura. Por causa disto, uma técnica não-destrutível foi desenvolvida a fim de avaliar a produção de biomassa e a análise de metabólitos tais como pigmentos, enzimas, açúcares, ácidos orgânicos presentes no meio agar.

Baar *et al.* (7) determinaram a biomassa fúngica dissolvendo o meio agar em água quente e filtrando as soluções antes de secá-las à 100°C por 24 h e determinando o peso seco de acordo com Oort (8). Como discutido por Jongbloed &

Borst-Pauwels (9), este método pode causar perda dos componentes solúveis na água. A perda de peso fúngico seco de *L. bicolor* foi estimado por Jongbloed & Borst-Pauwels (9) de aproximadamente 19%.

Gibson & Deacon (10) descreveram o desenvolvimento micelial de fungos ectomicorrízeos *in vitro* pelo crescimento radial e biomassa produzida. Jongbloed & Borst-Pauwels (8) fizeram uma hipótese que o crescimento radial reflete na verdade a exploração dos recursos presentes, sendo por outro lado, a biomassa produzida uma medida do acúmulo de carbono e de nutrientes.

O objetivo deste trabalho é apresentar algumas modificações na técnica empregada por Baar *et al.* (7) e analisada por Jongbloed and Borst-Pauwels (8) a fim de poder quantificar a concentração de glucose, o pH e a biomassa produzida após 5, 10 e 15 dias de incubação à 25°C para as linhagens de *Suillus collinitus* e *Pisosithus tinctorius* sobre diferentes meios de cultura (PDA, BAF , MNM, MP, GM8, MG). Esta técnica não destrutível está sendo utilizada agora para avaliar a produção de biomassa e analisar os metabólitos tais como os pigmentos, as enzimas e ácidos orgânicos presentes no agar e/ou na biomassa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem

Micélio das espécies ectomicorrízicas foram obtidos dos corpos frutíferos nas florestas de *Pinus*. *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch (PF 26) foi isolado na região de Murcia (Espanha) em 1991 e *Suillus collinitus* Fr. (Sc 24) na região da La Grande-Motte (sudoeste da França) em 1994.

Meios de cultura

O micélio das linhagens foi cultivado e mantido no meio PDA. A composição dos meios de cultura utilizados é dada a seguir.

Meios de cultura (g/l) 1) Meio PDA: 39,0 (pH 5.6). 2) Meio BAF: glucose, 30,0; peptona, 2,0; extrato de levedura, 0,2; KH_2PO_4, 0,5; $MgSO_4.7H_20$, 0,5; citrato férrico (1%), 0,5 ml; myo inositol, 5 ml; Solução de oligoelementos*, 1,0 ml; Solução de vitaminas**, 1,0 ml; agar, 15,0 (pH= 6,0). 3) Meio MG: glucose, 10,0; agar, 15,0 (pH=6,5). 4) Meio MP: glucose, 10,0; peptona, 2,0; KH_2PO_4, 0,5; $CaCl_2$., 0,1; $FeCl_3$, 0,01; Solução de vitaminas**, 1,0 ml; agar, 15,0 (pH=7,5) 5) Meio GM8: glucose, 31,25; peptona, 2,5; nitrato de cálcio, 2,0; asparagina, 1,0; tartrato de amônia, 1,0; agar, 15,0 (pH=5,0). 6) Meio MNM: glucose; 10,0; peptone, 2.0; extrato de malte, 3,0; $CaCl_2.2H_20$, 0,2; KH_2PO_4, 0,5; $(NH_4)_2HPO_4$, 0,5; $MgSO_4.7H_20$, 0,15; $FeCl_3$, 0,01; Thiamine HCl, 100-µg; Oligoelement solution*, 1,0 ml; agar, 15,0 (pH=5,0).

* Solução de oligoelementos (g/l): $CaCl_2$, 100,0; $MnSO_4$, 5,0; $ZnSO_4.7H_20$, 1.

** Solução de vitaminas (mg/l): Tiamina HCl, 500; Biotina, 10; Ácido Fólico, 100.

Inoculação e Incubação

Um disco de papel celofane, previamente estéril, é depositado sobre o meio de cultura nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro. Foram inoculadas centralmente com um bloco de micélio de aproximadamente (3 x 3 x 2 mm) tomado da extremidade de uma colônia de 15 dias de idade sobre o meio PDA.

As placas de Petri foram vedadas com "Parafilm". As culturas foram conduzidas à 25°C na obscuridade.

Análise

O diâmetro da colônia foi medido com uma régua a intervalos de tempo regulares, até 15 dias. Os resultados são expressos como uma média de 3 triplicadas.

O tratamento das amostras é efetuado segundo o esquema da Fig. 1. A colônia que cresceu sobre o papel celofane é separada e seu peso é determinado. Todo o meio agar (10 g) é ressuspenso em 90 ml de água destilada e homogeneizado durante 30 segundos no Potter à 4 °C.

A biomassa (peso seco) é determinada colocando-se o disco de celofane contendo o micélio a secar à 105 °C por 24 horas. O peso do disco de celofane foi determinado como uma média de 15 amostras.O açúcar consumido foi determinado pelo método de Miller (11).

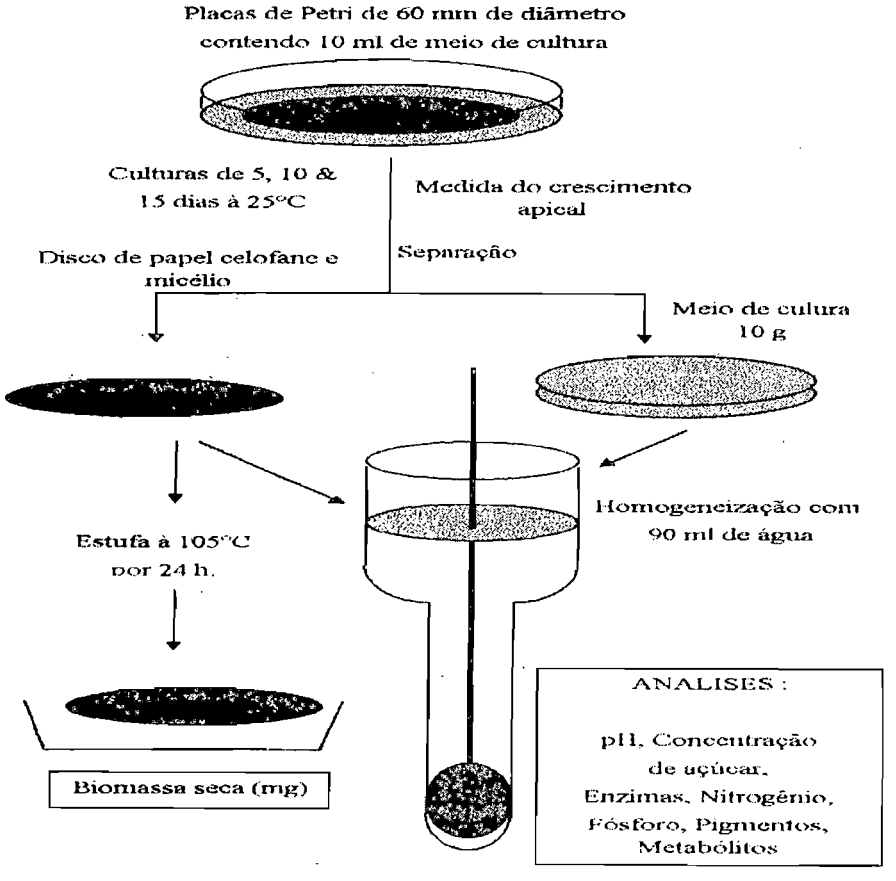


Figura 1. Esquema da cultura de fungo sobre papel celofane e tratamento das amostras para determinação da biomassa produzida e análise dos metabólitos produzidos durante o crescimento em superfície sólida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os valores de consumo de açúcar, biomassa produzida, diâmetro da colônia e pH das linhagens de *Suillus collinitus* e *Pisolithus tinctorius*.

Comparação do crescimento de *S. collinitus* entre diferentes meios de cultura

A Figura 2 mostra diferentes meios de cultura que foram testados para a escolha de um meio de cultura favorável a produção de biomassa e consumo de glucose. Pode-se afirmar que para a linhagem de *Suillus collinitus* (Sc 24), o meio PDA é o melhor meio de cultura testado. Após 15 dias de cultura, o consumo de açúcar foi de 96% (Tabela 2) e uma boa quantidade de biomassa foi produzida (7,1 g/l). Esta linhagem utiliza a glucose e os oligoelementos e minerais do meio PDA. O meio BAF, que é um meio sintético, é favorável à produção de biomassa e isto sugere que extrato de levedura, oligoelementos e vitaminas favorecem o crescimento de Sc 24. Por outro lado, o meio MNM, que é um meio inteiramente sintético, mostra que para Sc 24, as vitaminas não favorecem o crescimento e que a diminuição do pH após 15 dias de incubação é devido a presença de ions PO_4^{3-} na sua composição. Neste meio, o consumo de açúcar é de 93 % e a fonte de nitrogênio é o fator limitante neste meio.

Tabela 2: Evolução do pH, produção de biomassa e consumo de glucose após 15 dias de incubação à 25°C para a linhagem de *Suillus collinitus*.

Meios de cultura	Consumo de glucose (%)	Biomassa produzida (g/l)	Diâmetro da colônia (mm)	PH
PDA	96	7,1	45	5,0
BAF	69	8,6	50	4,2
MNM	93	3,9	45	3,5
MP	27	1,3	24	5,8
GM8	0	1,6	18	4,8
MG	42	1,6	32	4, 9

O meio GM8 contém como fonte de nitrogênio uma mistura de nitrato, asparagina, peptona e amônia. Mas, neste meio, ambas as linhagens não utilizam a glucose e pouca biomassa é obtida. Então, pode-se concluir que o nitrato à uma concentração de 2 g/l tem um efeito negativo para ambas as linhagens como observado anteriormente por De Araújo et al. (6).

O meio MG contêm somente glucose e agar na sua composição. Observou-se que o micélio apresenta um aspecto aéreo devido a composição pobre deste meio de cultura. O consumo de glucose é de 42 %, mas muito pouca biomassa é produzida. Pode-se supor que o fungo utiliza uma pequena quantidade de nitrogênio presente no inóculo (proveniente do inóculo de PDA) e pode-se afirmar que neste meio MG, obteve-se apenas o alongamento das hifas do micélio com um desenvolvimento pobre devido a não presença de nitrogênio no meio de cultura e os fungos ectomicorrízeos não são microorganismos fixadores de nitrogênio de acordo com Pelmont (1). O meio MP contêm glucose, peptona, mas não contêm extrato de levedura, sais de sulfato e solução de oligoelementos. Apenas 31 % do açúcar é consumido neste meio de cultura e muito pouca biomassa é produzida. O meio GM8, que não é um meio sintético, pois contêm peptona, apresenta nitrato na sua composição o qual é tóxico e não é utilizado como fonte de nitrogênio para o crescimento de Sc 24.

Permaneceremos com o meio PDA para os futuros experimentos. Esta escolha foi a mesma feita por Torres and Honrubia (12) que estudaram a influência do meio de cultura e do pH no crescimento de linhagens de fungos ectomicorrízeos isolados na região de Murcia e Albacete (Espanha), tais como: *Suillus collinitus*, *Suillus granulatus*, *Rhizopogon roselus*, *Rhizopogon luteolus* e *Amanita muscaria*. Eles cultivaram as linhagens em diferentes meios de cultura tais como: MMN, PDA, MEA 2% e Hagem, e variaram o pH entre 5,5 e 7,5. Para *S. collinitus*, após 60 dias de cultura à 24°C, encontraram que o meio PDA foi o melhor meio de cultura tendo a colônia apresentado um diâmetro de 8,5 cm

Comparação do crescimento de *P. tinctorius* entre diferentes meios de cultura

De acordo com a Fig. 3 e Tabela 3, um melhor desenvolvimento do micélio é observado sobre o maio PDA, BAF e MNM. Esta linhagem (PF 26) não utiliza a glucose nas mesmas proporções que Sc 24; após 15 dias de incubação no meio PDA, 48% da glucose ainda está presente e para o meio BAF, 59% está presente. Pode-se dizer que este consumo de glucose menor para a linhagem de PF 26 é devido, principalmente, ao crescimento deste fungo que é mais lento que ao Sc 24. Por outro lado, o BAF é um bom meio de cultura, apresentando uma produção de biomassa de 7,6 g/l. Talvez, a fonte de nitrogênio é o fator limitante para este fungo neste meio. Parece que a linhagem de PF 26, contrariamente a Sc 24, tolera a presença de nitrato; isto podendo explicar uma biomassa produzida de 2,7 g/l no meio GM8.

Figura 2.. Consumo de açúcar (símbolos vazios) e produção de biomassa (símbolos cheios) para *Suillus collinitus* cultivado durante 15 dias à 25°C. Meios de cultura: PDA (▒); BAF (△); MNM (○).

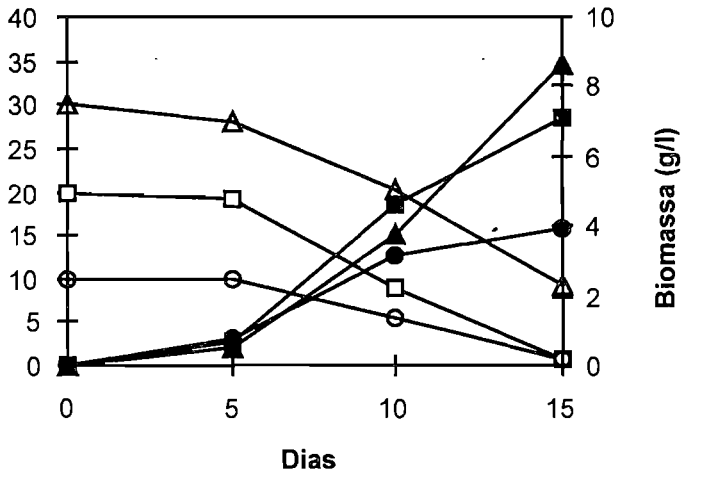
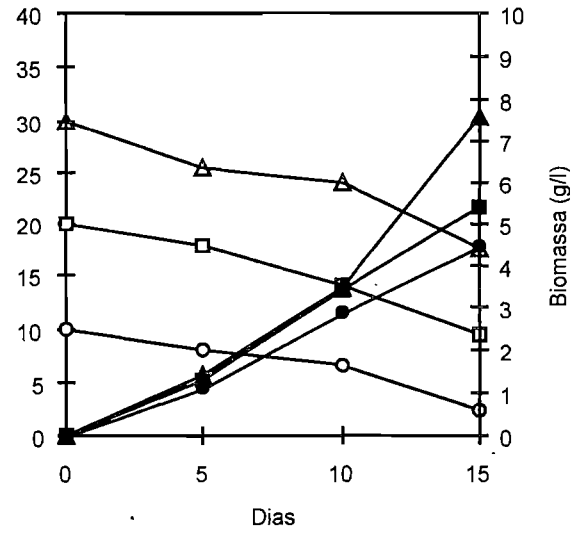


Tabela 3: Evolução do pH, produção de biomassa e consumo de glucose após 15 dias de incubação à 25°C para a linhagem de *Pisolithus tinctorius*.

Meios de cultura	Consumo de glucose (%)	Biomassa produzida (g/l)	Diâmetro da colônia (mm)	pH
PDA	52	5,4	23	5,8
BAF	41	7,6	37	4,3
MNM	77	4,5	43	3,4
MP	31	0,9	16	6,6
GM8	0	2,7	20	6,0
MG	24	1,4	33	5,7

Figure 3. Consumo de açúcar (símbolos vazios) e produção de biomassa (símbolos cheios) para *Pisolithus tinctorius* cultivado em diferentes meios de cultura durante 15 dias à 25°C. Meios de cultura: PDA (▒); AF (△); MNM (○).



CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que esta técnica para o crescimento de fungos, análise dos parâmetros tais como pH, consumo de açúcar no meio agar está bem estabelecida. Os valores obtidos de biomassa produzida, consumo de açúcar e pH permitem otimizar as condições de cultura e estudar a fisiologia e o metabolismo de fungos micorrízeos sobre meios de cultura com agar. A grande vantagem desta técnica está baseada no fato que é um método de tratamento das amostras não destrutível, em outras palavras, utilizando-se o homogeneizador e trabalhando à baixas temperaturas, (4°C), todas as enzimas e metabólitos produzidos podem ser detectados e quantificados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Drs. D. Mousain e C. Plasard (Institut National de Recherche Agronomique, Montpellier, França) por fornecerem as linhagens de fungos ectomicorrízeos. Álvaro A. De Araújo agradece ao Governo Brasileiro (CNPq) por sua bolsa de estudos que foi gerada por SFERE - França (Société Française d'Exportation des Resssources Educatives). Esta pesquisa foi financiada pela Comunidade Européia, programa MYCOMED n°AIR2 - CT 94-1149 e IRD, Dept. DRV..

REFERENCIAS

1. Pelmont, J. (1993), *Bacteries et environnement.* 1st ed., Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble.

2. Mousain, D. (1993), *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides.* 1st ed.,Editions John Libbey, Eurotext, Montrouge.CEE Project " MYCOMED ", Contract Number AIR 2-CT-94-1149, Final Progress Report.

3. Strullu, D. G. (1991), *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées*, 3rd ed., Lavoisier. Paris.

4. Marx, D.H. and Cordell, C.E. (1994), In: J.M. Whipps & R.D. Lumsden (Eds). *Biotechnology of fungi for improving plant growth.* 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1-25.

5. Mousain,D., Plassard, C., Roussos, S., Brunel, B., Karkouri, K. E., Fréchet, C.C., Laguette, A.G., Bouckcim, H., Gobert, A., De Araujo, A.A. (1998) *Improvement of the quality of forest seedlings Pinus pinea, Pinus halepensis, Pinus nigra subsp. laricia, Quercus suber) and MEDiterranean reforestation using controlled MYCorrhizal infection (MYCOMED). Final Progress Raport* CEE Contrat n° AIR 2-CT-94-1149.

6. De Araujo, A.A., Hannibal, L., Plassard, M., Mousain,D. and Roussos, S., (1998), *Micol. Neotrop. Apl.* **11**, 23-34.

7. Baar, J., Comini, B., Elferink, M.O., and Kuyper, Th. W. (1997) *Mycol. Res.* **101 (5)**, 523-529 .

8. Oort, A. J. P. (1981), *Verhandelingen. Koninklilke Nederlandse akademie van Wetenschappen, Afdeling Natuurwetenschappen,* 2nd. **76**, 1-87

9. Jongbloed, R.H. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1990), *Acta Bot. Neerl.* **39**, 349-358.

10. Gibson, F. and Deacon, J.W. (1990), *Mycol. Res.* **94 (2)**,166-172 .

11. Miller, G.L. (1959), *Anal. Chem.* **31**, 426-428.

12. Torres, P. and Honrubia, M. (1991), *Cryptogamie Mycol.* **12 (3)**, 183-192.

CHARACTERISATION OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* ISOLATES FOR POTENTIAL USE AGAINST THE COFFEE BERRY BORER

Patricia E. Vélez, María T. González, Armando Rivera, Alex E. Bustillo, María N. Estrada & Esther C. Montoya.

Centro Nacional de Investigaciones de Café, Chinchiná, Caldas, Colombia
Instituto para la Ciencia y Tecnología, Colciencias, Santafé de Bogotá, Colombia.

Key words: Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Coffee.

ABSTRACT

The efficacy of biological control agents depends on the knowledge of their biology, the environment and the mechanism of interaction between parasite and host. In this study exact number of multisporic isolates of the entomogenous fungus Beauveria bassiana (Bb), were characterised according to: pathogenicity against coffee berry borer-CBB, Hypothenemus hampei (Ferrari), LT_{50}, spore production, rate of mycelial growth, spore size, germination rate, enzyme reaction and time of enzyme reaction. Similar analysis was carried out using Metarhizium anisopliae (Ma). In a preliminary analysis, the isolates were classified according to pathogenicity against CBB, establishing 4 groups. The analysis of variance of the groups (p=0,05) showed significant differences among the isolates in the variables pathogenicity against CBB, LT_{50}, spore production, mycelial growth, germination rate, enzyme reaction & time of enzyme reaction for Bb and the variables pathogenicity against CBB and germination rate for Ma; the Tukey test (5%) showed differences in Bb & Ma groups, in the variable pathogenicity against CBB. A multivariate principle component analysis was carried out with a group of 17 isolates of Bb in which all the mentioned variables were evaluated. Likewise, a dendrogram (descriptive grouping) and a cluster statistic analysis were done in order to select groups of isolates according to the evaluated variables. The components that contributed most to the total variation were: enzyme reaction, time of enzyme reaction, pathogenicity against CBB and spore production. In contrast, time of enzyme reaction, LT_{50}, mycelial growth and germination rate, accounted for a lower degree of variation. The dendrogram and the cluster statistical analysis separated three groups of isolates. The analysis of variance of the groups classified by cluster analysis showed differences between them, the Tukey test (5%) showed that the groups were statistically different in the variables pathogenicity against CBB, enzyme reaction, spore production, mycelial growth and LT_{50}. The variable pathogenicity to CBB allowed the separation of groups of isolates in both type of analysis. The characterisation of the collection isolates in our study has enabled us the selection of those variables that contributed most to the separation of groups of isolates, to establish relationships between them according to their biology and locality, to define their host specificity and their potential to control the CCB and other insect pests of economic importance in Colombia and other countries.

INTRODUCTION

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), is the most serious pest of coffee in Colombia and many other countries. This pest originated in central Africa and was accidentally introduced to Brazil at the beginning of the century (Murphy and Moore 1990). Since its arrival in Colombia in 1988, the Colombian Coffee Growers Federation and its research centre, CENICAFÉ, have promoted extensive research into alternative control strategies using an Integrated Pest Management system. Biological control with parasitoids and with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* are promising control methods, offering an environmentally benign alternative to chemical pesticides (Cadena 1993). Coleoptera are known to be susceptible to *B. bassiana* and infection of CBB can occur in two ways. The fungus may have spread with the pest as the latter colonised new geographic areas or it may have "jumped" from other local insects (Bridge *et al.* 1990). It was of interest to us to assess fungal isolates from different hosts and geographic areas to be able to identify variability among them accurately, in order to select the best strain with adaptive characteristics favouring its survival and to optimise its effectiveness as a mycoinsecticide against CBB. To accomplish

this, it is necessary to understand its genetics, physiological aspects, virulence factors, etc. In order to exploit the potential application of *B. bassiana* collection against CBB in Colombia, we used morphological and biochemical techniques to characterise and compare *B. bassiana* isolated from CBB and other insects in Colombia and other countries.

MATERIALS AND METHODS

Isolates tested: We examined 73 isolates of Bb and 19 of Ma, from the culture collection held in the Entomology Department of the Coffee National Research Centre in Colombia. Isolates were grown on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for 15 days at 25°C and passed once on comminuted cuticle from adult CBB (Vélez *et al.* 1997) in order to maintain their infectivity to the target host.

Viability: Viability was determined as % germination in culture after 30 days of growth in SDA. Five aliquots of 5µl (1 x 10^6 spore/ml) were placed each (n = 10). Plates were incubated for 24-48h at 25 °C, one drop of lactophenol blue was added to each aliquot in order to stop the germination process and microscopic examination at 40x of the germinated spore was carried out. The percent germination was computed on the basis of the number of spore producing germ tube per 100 counted in each aliquot. A germinated conidium was defined as one which had produced a germ-tube equal to or greater than the width of the conidium (Vélez *et al.* 1997).

Pathogenicity: Sixty adult female CBB, divided into six groups of ten, were maintained individually in vials in a controlled environment chamber at 27 °C and 80-85 % RH. To determine pathogenicity adult CBB were submerged two minutes in a spore suspension of the fungi (1 x 10^7 spore/ml sterile distilled H_2O, 1 % Tween 80), with constant manual shaking. Pretreated CBB were confined in a 4 ml glass vial containing one coffee bean (45 % RH) as the borer substrate, wetted filter paper and capped with a piece of sterile cotton and maintained at 23 °C and 80 % RH. Additional 60 adults female CBB were not infected and were included as control. Over 10 days, mortality and presence of sporulating fungus (symptoms and signs) on the insects were recorded using a stereoscopic microscope (González *et al.* 1993; Vélez *et al.* 1997). Lethal time fifty (LT_{50}) was measured by taking into account the time in which the inoculum of the fungus caused 50% of mortality on the insect population.

Rate of mycelial growth: Mycelial growth was measured on colonies growing on SDA. Each plate was inoculated at the centre with 5µl of fungal spore suspension (1 x 10^6 spore/ml) and incubated at room temperature (25 °C) for 5 days. Each treatment was replicated 10 times. After incubation, the diameter of the colony up to 30 d was measured. A mean diameter was calculated for each isolate.

Spore Size: Spore diameter was determined using a compound light microscope fitted with a ocular micrometer. For each isolate, mean diameter was calculated based on measurements of 100 spores.

Spore production: We quantified spore production in all of the isolates by enumerating spores from 8, 15 21 and 30 day old cultures grown on SDA. Spores from these cultures were suspended in 5 ml of 1% Tween 80, diluted (1/10), and spores counted using a haemocytometer. Ten replications for treatment and six counts for replication were recorded (Vélez *et al.* 1997).

Enzyme reaction: Production and activity of extracellular enzymes were screened through the technique that involved incorporating particular substrates into modified agar growth media; degradation of the substrate was then detected after growth either by a colour change (pH indicator), a reduction in opacity, or liquefaction. The enzyme systems tested using this method were esterase, gelatinase, caseinase, lipase. The nitrogen sources evaluated were: urea, peptone and yeast extract and the carbon sources: citrate, starch, lactose, lanolin, N-acetyl glucosamine and glucosamine (Paterson & Bridge, 1994; Mugnai *et al.* 1989). Six plates were set up for each treatment. Biochemical test results were analysed using the percent of plates that gave some change of colour. The time at which substrate utilisation was visible by colour change, reduction in opacity or liquefaction was assessed for each isolate.

Statistical analysis: Isolates of Bb and Ma were classified according to pathogenicity against CBB, establishing 4 groups: group 1, pathogenicity <25%; group 2, 26% - 50%; group

3, 51% - 80%, and group 4, >80% (Table 1). Variance analysis of the groups and Tukey test (p=0,05) were carried out.

A multivariate principle component analysis was carried out with a group of 17 isolates of Bb in which all the following variables were evaluated: pathogenicity against CBB, LT_{50}, germination rate, enzyme reaction, time of enzyme reaction, spore production, mycelial growth and spore size. Likewise, a dendrogram and cluster statistic analysis were performed in order to select groups of isolates according to the evaluated variables, variance analysis of the clusters (p=0,05) and Tukey test (5%) were applied to the groups of isolates.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of Pathogenicity Beauveria bassiana: In group 1, were 6 isolates from Colombia, four of them from Antioquia; one from Thailand and one from Philippines. Among the most virulent isolates, were isolates from different insect families i. e. from Coleoptera, Scolytidae; from Coleoptera: Curculionidae; from Coleoptera: Scarabaeidae and from Homoptera; 2 from unknown origin and 1 from a commercial formulation. 17 of these virulent isolates were obtained from Colombia, four from Antioquia and four from Risaralda, two of them of origin unknown and the other one from other countries.

An analysis of variance of pathogenicity against CBB, LT_{50}, spore production, mycelial growth, germination rate, enzyme reaction and time of enzyme reaction for Bb and the variables pathogenicity against CBB and germination rate for Ma, showed differences in Bb & Ma groups in the variable pathogenicity against CBB (Tukey test p=0.05) (Tables 1 & 2)

The results show a direct positive relationship between pathogenicity against CBB and germination rate for the most pathogenic isolates of Bb (Table 1). The group 4 showed lower values for LT_{50}. It is remarkable that there were no differences for this variable between groups 3 & 4, which suggests that isolates with pathogenicities higher than 50%, do not differ in LT_{50}, while, pathogenicities lower than 50% (groups 1 & 2), do show strong differences in LT_{50} (Table 1).

The results show a positive relationship between enzyme reaction and spore production (group 3). That relationship was maintained in groups 1 & 2. The lowest values were found in the isolates of group 4.

The most pathogenic group of isolates of Bb (group 4) was composed of 24 isolates, 15 belonging to the Coleoptera. From this group, 11 were isolated from the Scolytidae. Three from the Curculionidae and one from the Scarabaeidae. In addition, this large group included five isolates from Lepidoptera, two from the Pyralidae, and one each from the Stenomidae, Geometridae and Cossidae. Regarding the geographical origin of Bb isolates, 17 came from Colombia, five from other countries: China, Thailand, Ecuador and Italy. Two of them were of unknown origin.

In the Bb Colombian isolates of this group were four from Antioquia and four from Risaralda; this could be a reisolation of the same fungal strain within a specific region with similar climatic conditions i.e, from 19.2 to 22.1°C, from 1200 to 1590 m and 74 to 86% RH; the isolates were found most frequently in coffee plantations (Posada & Vélez, 1998). Germination rates of the isolates of this group were between 75 & 92% with values higher than 80% in most of the isolates; the enzyme reactions showed averages between 41 & 75%, most of them between 50 and 60%.

On the other hand, isolates of Bb with < 25% (group 1) pathogenicity for CBB were composed of eight isolates, five from CBB. Additionally, in this group, isolates from Lepidoptera and Homoptera were found. They were isolated in Colombia (6), four in Antioquia (three of them from CBB) and one in Risaralda. Two were from Thailand and Philippines. The isolates of Bb from this group showed an average pathogenicity of 14%, with a minimum value of 5 and maximum of 25%. The average germination rate was 71% and ranged between 20 & 89 and the average enzyme reaction was 75% and ranged between 43 and 100%. In this group of Bb, no relationship was observed between pathogenicity and germination rate (Table 1).

Regarding the weather conditions such as temperature, relative humidity and altitude where isolates of this group were collected, observed day mean temperatures were between 19.2 to 21.6°C, RH between 74 to 86% and altitude, ranged between 1200 and 1500 m. Additionally, most of them were found in coffee plantations (Posada & Vélez, 1998).

With respect to the relationship between host and locality, the results suggest a certain specificity for the CBB within the most pathogenic isolates, as 61% of the isolates came from Coleoptera, and

43% of these came from CBB. This is in agreement with Prior (1992), bearing in mind that virulence may be higher when the isolates come from the same host insect. However, the CBB isolates in the least pathogenic group of isolates (62.5%), did not show any relationship with virulence against CBB. So, these results do not allow us to infer specificity in those isolates.

Another and contrasting possibility is that the pathogenicity of the group 1 isolates could be explained on coevolution criteria, which suggests an equilibrium between host and pathogen over a long period (Prior, 1992). Thus the most virulent pathogen could be from hosts other than CBB (Hokkanen & Pimentel,1984; Waage, 1990). In pathogenicity groups 2 & 3, it was observed that 30.3% & 62.5% of isolates, respectively came from CBB and they did not show a high virulence for CBB. Isolates from Lepidoptera and Homoptera showed higher levels of pathogenicity for CBB (group 4) (Table 1).

According to these criteria, it is suggested that the search for entomogenous fungi should be conducted in different places from that where the insect pest is found (Hokkanen & Pimentel, 1984; Waage, 1990, Prior, 1992 ; Hajek & St. Leger, 1994).

Metarhizium anisopliae: Two pathogenicity groups were established for Ma. Most of the isolates killed more than 80% in the tests: 9 from Colombia, 3 from Antioquia (Coleoptera) (Table 2).

The results showed a direct relationship between enzyme reaction and germination rate, so the group 3 showed the higher averages; however, this trend was not maintained in group 4 isolates. There was no evident relationship between pathogenicity and germination rate in the groups of Ma (Table 2).

The most pathogenic Ma isolates (group 4) consisted of 18 isolates, 9 from Coleoptera, including six from Scarabaeidae, one from Curculionidae and one from Scolytidae. Additionally, the group contained four isolates from Homoptera and one from Hymenoptera. Ma isolates came from, Colombia (9), USA (1), Australia (3), Brazil (1), Belize (2), New Zealand (1) and one isolate of unknown origin. In the Colombian isolates, were remarkable three from Antioquia Department (Coleoptera), one from Nariño, one from Tolima and two from Caquetá. Since the majority of Ma isolates belonged to Coleoptera: Scarabaeidae, it could be assumed certain specificity toward insects of this family.

Multivariate analysis: Taking into account the variables tested in the Bb isolates, the multivariate analysis showed that the components that contributed most to the total variation were: enzyme reaction, time of enzyme reaction, pathogenicity against CBB and spore production, in contrast, time of enzyme reaction, LT_{50}, mycelial growth and germination rate, accounted for a lower degree of variation.

The dendrogram separated 3 groups of isolates in a descriptive way (Figure 1). For the cluster statistical analysis the isolates were grouped, so that those with pathogenicity against CBB ranked between 53 & 80% were assigned to cluster 1; isolates with pathogenicity against CBB >80%, in cluster 2 and finally, those with pathogenicity against CBB <53,3 % in cluster 3. The analysis showed three groups of them: six isolates in group 1; six isolates in group 2, and five isolates in group 3. Bb 9305 were not in the same group of the dendrogram (Table 3). The analysis of variance of the groups classified by cluster analysis showed differences between them, the Tukey test (5%) showed that the groups were statistically different in all the evaluated variables (Table 3).

From the results, the variable % of pathogenicity to the CBB, used as classification criteria in the preliminary analysis, was one of the components which had a major contribution to the total variation, according to multivariate analysis. Additionally this variable and the mycelial growth allowed the separation of different clusters in the statistical analysis.

It was notable that cluster 2, with the highest pathogenicities, had the lowest average of spore production and enzyme reaction. Additionally, that cluster showed the lowest averages of LT_{50} (Table 3).

The highest averages of pathogenicity against CBB, mycelial growth, germination rate and time of enzyme reaction were showed by isolates from cluster 2, evidencing a direct relationship between those variables. However, in this cluster the variables LT_{50}, spore production and enzyme reaction presented the lowest averages. The pathogenicity against CBB and enzyme reaction did not match with the reports in which enzyme activity is related to the virulence against the pest (St. Leger *et al.* 1988; Bidochka and Khachatourians, 1990). Likewise, previous experiments have shown there is no relationship between pathogenicity against CBB and spore production (Narváez, 1996) (Table 3).

Cluster 3 showed the lowest averages in pathogenicity against CBB and mycelial growth (Table 3), however, in this cluster the highest averages of LT_{50}, spore production and enzyme reaction were registered.

The characterisation of the collection isolates allowed selection of those variables that contributed most to the separation of isolates by groups, to identify strains, to establish relationships between them according their biology and locality, to define their host specificity and their potential to control the CCB and other insect pests of economic importance in Colombia and other countries.

Table 1. Average, variation, minimum and maximum values of the variables tested in *Beauveria bassiana*.

GROUP	1		2		3		4	
VARIABLE	0	C.V.	0	C.V.	0	C.V.	0	C.V.
% Pathogenicity	14,09 **d***	70,35	40,48 **c**	40,09	67,34 **b**	21,27	88,87 **a**	10,89
LT_{50} (days)	5,76 **a**	22,17	5,05 **b**	13,79	4,38 **c**	17,04	4,32 **c**	18,39
Spores production (10^8)	12 **b**	128,89	11 **bc**	76,94	14 **a**	81,31	9 **c**	126,09
Mycelial growth rate(cm)	0,19 **c**	15,81	0,21 **ab**	55,01	0,20 **bc**	35,47	0,22 **a**	39,76
Spore size (µ)	2,33 **a**	18,01	2,28 **a**	18,87	2,27 **a**	14,83	2,36 **a**	19,23
% Germination	70,94 **c**	35,32	71,57 **c**	17,30	75,83 **b**	18,47	78,77 **a**	21,40
% Enzyme reaction	75 **a**	54,25	70 **a**	61,71	75 **a**	55,12	62 **b**	72,43
Time of enzyme reaction (days)	6 **b**	72,31	7 **a**	55,44	6 **b**	64,88	6 **a**	62,89

Means not followed by common letter are significantly different (P=0.05) by Tukey test.

Table 2. Average, variation, minimum and maximum values of the variables tested on *Metarhizium anisopliae*.

Group	3				4			
Variable	Min.	0	Max.	C.V.	Min.	0	Max.	C.V.
% Pathogenicity	40	55,47 b	60	15,07	82,58	88,73 a	100,0	8,97
% Germination	90,48	96,80 a	100,0	2,81	13,11	64,88 b	99,20	52,41
% Enzyme reaction	100	100,0 a	100	0	87,0	96,0 a	100,0	19,08
Time of enzyme reaction (days)	2	6 a	7	98,49	3,0	5,0 a	8,0	100,24

Means not followed by common letter are significantly different (P=0.05) by Tukey test.

Table 3. Average and variation of the new cluster analysis grouping of *Beauveria bassiana* isolates formed according to % pathogenicity to the coffee berry borer.

Variab.	Isolates	% Pathogenicity		LT_{50} (days)		Spore Production (10^8)		Mycelial growth rate (cm)		Spore size (u)		% Germination		% Enzyme Reaction		Time of enzyme reaction (days)	
Group	Bb	0	C.V	0	C.V	0	C.V	0	C.V	0	C.V	0	C.V	0	C.V	0	C.V
1	9005, 9416, 9008, 9023, 9117, 9209,	70.5b	22.3	4.8 b	22.7	15 a	70.9	0.2 b	32.5	2.2 b	17.4	73.2 b	27.3	68 a	64.2	6 b	65.3
2	9012, 9021, 9116, 9207, 9204, 9212	90.1 a	8.8	4.6 b	23.7	6 b	94.3	0.2 a	35.0	2.4 a	19.1	83.9 a	8.1	57 b	84.3	7 a	62.4
3	9010, 9101, 9120, 9108, 9305,	25.7 c	69.4	6.1 a	18.3	17 a	102.3	0.2 c	13.7	2.2 b	16.8	83.7 a	9.3	74 a	55.8	6 b	61.1

Means not followed by common letter are significantly different (P=0.05) by Tukey test.

REFERENCES

BIDOCHKA, M. J. & KHACHATOURIANS, G. G. (1990). Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes, Journal of Invertebrate Pathology* **56**, 362 - 370.

BRIDGE, P. D.; ABRAHAM, Y. J.; CORNISH, M. C.; PRIOR, C. & MOORE, D. (1990). The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), *Mycopathologia* **111**, 85-90.

CADENA G.,G. Políticas de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia para el control de la broca del café. In: CONGRESO de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20. Cali (Colombia), Julio 13 – 16, 1993. Resúmenes. Cali (Colombia), SOCOLEN, 1993. P. 110. Esp.

GONZÁLEZ, M. T; POSADA, F. J., & BUSTILLO, A. E. (1993). Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, *Cenicafé* **44**, 93-102.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts, *Annual Review of Entomology*. **39**, 293-322.

HOKKANEN, H. M. T., PIMENTEL, D. (1984). New approach for selecting biological control agents, *Canadian Entomologist* **116**, 1109 - 1121.

MUGNAI, L.; BRIDGE, P. D. & EVANS, H. C. (1989). A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*, *Mycological Research* **92**, 199 - 209.

MURPHY, S.; MOORE, D. (1990). Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. Biocontrol News and Information. 11(2):107-117.

NARVÁEZ, M del P. (1996). Estimación de la cantidad de esporas producidas por los aislamientos patogénicos e los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* cultivados en arroz y sobre la broca del café. Manizales (Colombia), Universidad Católica de Manizales. Facultad de Bacteriología, 66 p. 47 Refs. (Tesis Bacterióloga y Laboratorista Clínica).

PATERSON, R. R. M. & BRIDGE, P. D. (1994). *Biochemical techniques for filamentous fungi.* IMI Technical Handbooks: No 1. CAB International. Surrey. Wallingford.

POSADA, F. J & VÉLEZ, P. E. (1998). Registro de hospedantes y aislamientos de *Beauveria bassiana* en la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé, Colombia, *Manejo Integrado de Plagas* No. 46 p. 50 - 64, 1997.

PRIOR, C. (1992). Discovery and characterisation of fungal pathogens for locust and grasshopper control. In: *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. International Institute of Biological Control. (Lomer, C. J.; Prior, C. Eds.). CAB International, Melksham, UK. p. 230 - 238.

ST. LEGER, R. J., DURRANDS, P. K., CHARNLEY, A. K., & COOPER, R. M. (1988). Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*, *Journal of Invertebrate Pathology* **52**, 285 - 292.

VELEZ, P. E.; POSADA, F. J.; MARIN, P.; GONZALEZ, M. T.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. E. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico Cenicafé No.17. 34p.

WAAGE, J. (1990). Ecological theory and the selection of biological control agents. In: *Critical issues in biological control.* (Mackauer, M., Ehler, L.E. & Roland, J. Eds.). Intercept, UK, p. 135 - 157.

PRIMEIRA INTRODUÇÃO NO BRASIL DO ENDOPARASITÓIDE *Phymastichus coffea* (LASALLE) (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE), PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA BROCA-DO-CAFÉ *Hypothenemus hampei* (FERRARI) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE).

Fernando Cantor[1], Evaldo F. Vilela[1] & Alex E. Bustillo[2]

[1]Depto. Biologia Animal/UFV, Viçosa, MG, 36571-000,
[2]Centro Nacional de Investigaciones del Café, CENICAFE. Chinchiná (Caldas), Colômbia.

INTRODUÇÃO

São vários os parasitóides que controlam a broca-do-café, principalmente na África, de onde dois deles foram introduzidos no continente americano, visando ao controle biológico populacional dessa praga. São os casos do México e da Colômbia, com a introdução da vespa de Uganda *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bethylidae), e da vespa da Costa do Marfim *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethylidae).

O Brasil iniciou, nos anos 20, um programa de controle biológico da broca, com a introdução da vespa de Uganda, no Estado de São Paulo. Este programa, no entanto, foi descontinuado em função da popularização dos inseticidas sintéticos, prejudiciais aos inimigos naturais (Bergamin, 1943). Na década de oitenta, retomou-se o interesse pelo controle biológico da broca-do-café, com a nova introdução da vespa da Costa do Marfim, realizada pela antiga Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária - EMCAPA (Linhares, ES). No entanto, como no caso de *P. nasuta*, os resultados não têm sido contundentes no controle da broca.

IMPORTÂNCIA

Recentemente, foi constatado pela primeira vez, na África, o parasitóide *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae), identificado como um novo gênero e espécie com potencial biológico para o controle da broca-do-café (LaSalle, 1990).

Este parasitóide é originário de regiões próximas ao local de origem da praga, e se diferencia dos demais por atacar fêmeas da broca-do-café em idade adulta e, também, porque seus ovos são colocados no interior do inseto hospedeiro

Como reportado por Gutierrez *et al.* (1998), um controle mais eficaz da broca-do-café poderia ser conseguido com o uso deste novo parasitóide, obtendo-se, para isto, as informações que permitirão estabelecer as potencialidades deste inimigo natural, nas diferentes regiões produtoras de café, considerando, ainda, a eficiência dos demais parasitóides presentes nos cafezais.

Com esta recente descoberta do *P. coffea,* abre-se uma nova possibilidade de controle desta praga utilizando inimigos naturais, para todos as regiões do mundo onde *H. hampei* constitui-se num sério problema.

ACORDO BILATERAL ENTRE CENICAFE (Colômbia) e BIOAGRO/UFV (Brasil)

P. coffea está sendo multiplicado nos laboratórios do CENICAFE, na Colômbia e, por meio de um Acordo Bilateral de Cooperação Técnico-Científico, envolvendo o CENICAFE e a Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO), está sendo avaliada a introdução deste parasitóide no Brasil. Para isto, estudos de biologia, ecologia e comportamento de *P. coffea* estão sendo conduzidos, em laboratório, dentro do Acordo, tendo sido tentada uma introdução do referido parasitóide, via Laboratório Quarentenário "Costa Lima"/Embrapa, porém sem sucesso.

REFERÊNCIAS

Bergamin, J. 1943. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col. Ipidae). Arquivos do Instituto Biológico. 14, 31-72

Gutierrez, A.P., A. Villacorta, J.R. Cure, & C.K. Ellis. 1998. Tritrophic analysis of the coffee (*Coffea arabica*) - Coffee berry borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] - [parasitoid system. An. Soc. Entomol. Brasil. 27, 3357-386.

LaSalle, J. 1990. A new genus and species of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae) parasitic on the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrrari) (Coleoptera: Scolytidae). Bull. Entomol. Res. 80, 7-10.

EXTRACCION Y EVALUACION DE AMILASAS DIGESTIVAS DE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

Claudia P. Martínez Díaz. Arnubio Valencia Jiménez. [2]María Teresa González G.[1] Alex E. Bustillo Pardey. [1]

[1] Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. AA N°2427. Manizales-Colombia.
[2] Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas-Colombia
E-mail: arnubio@emtelsa.multi.net.co

Palabras claves: *Hypothenemus hampei, Broca café, café, enzimas*

RESUMO

En el tracto digestivo de los insectos, se encuentran presentes las amilasas, las cuales participan activamente en la digestión del almidón; con miras a suministrar la glucosa necesaria para el metabolismo energético del insecto. Un conocimiento detallado de la actividad amilolítica existente en H. hampei, se constituye en una necesidad apremiante, en especial cuando se requiere seleccionar inhibidores específicos que puedan ser utilizados para la producción de café transgénico resistente al insecto. Con miras a conocer el perfil isoenzimático, el pH y temperatura óptima para la actividad de la enzima, se procedió a homogeneizar 0,5 g de adultos con 2,5 ml de las diferentes soluciones de extracción: H_2O, NaCl 1% y soluciones amortiguadoras de pH (3,0 a 8,0). El pH óptimo se analizó utilizando buffers de pH 3,0 a 9,0. La temperatura óptima de actividad de la enzima se estimó a temperaturas entre 25 y 70°C. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 580 nm. El análisis isoenzimático se llevo a cabo por electroforesis en geles nativos del 10%. Los resultados encontrados, mostraron que el mejor medio de extracción fue NaCl al 1%, el pH óptimo de actividad es de 5,0 y la temperatura óptima se presenta a 40°C. En H. hampei se encontraron varias bandas de actividad, dos de las cuales al parecer son enzimas mayoritarias.

INTRODUCCION

En los estudios dirigidos a combatir y proteger los cultivos de los insectos que atacan a las plantas, es importante tener un mejor conocimiento sobre la bioquímica de los insectos y en particular sobre las enzimas más importantes involucradas en los procesos digestivos, de forma que conociendo estas enzimas, pueda diseñarse una estrategia que permita bloquear o interrumpir su función, es decir, producir una inhibición dirigida específicamente contra esta enzima (Blanco *et al.*, 1996).

El metabolismo digestivo de los insectos se asemeja al de los vertebrados. Como estos, poseen enzimas adaptadas a la dieta de la que se alimentan. Si viven de una dieta particularmente rica en una sustancia, generalmente producirán abundantes enzimas para su digestión (ej. amilasas para dietas ricas en carbohidratos), y si por el contrario, la dieta es altamente restringida, las enzimas presentes serán correspondientemente limitadas (Applebaum,1985). La mayor parte del alimento requerido para la nutrición de los insectos consiste de polímeros como el almidón, celulosa, hemicelulosa y proteínas. El proceso digestivo de éstos ocurre en tres fases, durante la fase inicial, se lleva a cabo la disminución en el peso molecular de compuestos poliméricos mediante la acción de hidrolasas poliméricas (amilasas, celulasas, hemicelulasas y endoproteasas); los oligomeros resultantes son hidrolizados en la etapa intermedia por hidrolasas oligoméricas, que actúan sobre fragmentos parcialmente degradados. Los productos de esta fase son dímeros o pequeños oligómeros tales como maltosa, celobiosa y dipéptidos. En la etapa final de la digestión, los dímeros se rompen en monómeros por hidrolasas como maltasa, celobiasa, dipeptidasas, tripeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas las cuales se hallan generalmente localizadas en la membrana epitelial del intestino (Terra, 1990). Es muy probable que las carbohidrasas digestivas de los insectos hidrolicen poli, oligo y disacaridos a sus correspondientes monosacáridos para prepararlos para su absorción de manera similar a las carbohidrasas de vertebrados. En estos últimos, las hidrolasas poliméricas son secretadas principalmente por las glándulas salivales y el epitelio del intestino medio. Se reconocen dos categorías de carbohidrasas, las cuales se

denominan comúnmente como α-amilasas y β-amilasas. Las α-amilasas (1,4-α-D-glucan glucanohidrolasas), se caracterizan por atacar enlaces glicosídicos internos de almidón o glicógeno. Se considera que el ataque (α-1,4) produce rompimientos al azar que generan una mezcla de dextrinas de longitudes de cadena variable, aunque algunas evidencias señalan que la hidrólisis del almidón sigue un cierto orden (Bohinski, 1983).

Las amilasas de los insectos juegan un papel muy importante en la digestión del almidón presente en la semilla. El orden Coleoptera es extremadamente grande, en consecuencia es difícil hacer generalización acerca de la distribución de las enzimas digestivas de estos o de un insecto en particular. La digestión del almidón por amilasas de insectos ha sido demostrada en *S. granarius* (Silano *et al.*, 1975; Baker, 1983); *Tribolium castaneum* (Krishna y Saxena,1962); *Trogoderma* spp. (Krishna, 1955); *Rhyzopertha dominica* (Baker, 1991); *Sitophillus zeamais* (Baker, 1983; Sandoval-Cardoso, 1991); *Sitophillus orizae* (L) (Baker, 1987; Yetter *et al.*, 1979); *Callosobruchus maculatus* (Campos *et al.*, 1989); *Zabrotes subfasciatus* (Lemos *et al.*, 1990) y *Tenebrio molitor* (Applebaum, 1964). Un mejor entendimiento de las enzimas involucradas en la utilización del alimento por el insecto, y de sus principales propiedades, permitirá un mayor entendimiento del papel que desempeñan en los mecanismos de resistencia del insecto frente a potenciales inhibidores. En el presente trabajo se describen varias propiedades de amilasas encontradas en adultos de *Hyphotenemus hampei*.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Material Biológico: Las brocas procedían de la unidad de cría de parasitoides de Cenicafé (Chinchiná-Caldas), recién emergidas, criadas en café pergamino seco con una humedad del 45%, y mantenidas a temperatura de 27°C y humedad relativa del 65% - 75%.

Determinación de la actividad amilasa: La actividad amilasa se determinó por el método de Hopkins y Bird, 1954. 50 µl de solución de la enzima se incubó por 15 minutos a 30°C con 650 µl de buffer citrato 0.05M pH 5,0 conteniendo 10 mM de NaCl y 20 mM de $CaCl_2$ y 500 µl de una solución 0.125 % de almidón (Almidón soluble, Sigma Chemical Co.) en 50 mM de buffer citrato pH 5,0. La reacción se detuvo tras la adición de 5 ml de solución de Iodo (I: 0.5 % y KI: 5 %). La absorbancia de las muestras fue leída a 580 nm utilizando para ello un espectrofotómetro UV/VIS marca UNICAM.

Extracción de la enzima: La enzima fue extraída, homogeneizando 0,5 gramos de brocas adultas con 2,5 ml de una solución NaCl al 1%. El homogeneizado se centrifugó a 1000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante resultante fue almacenado a –20°C como fuente de la enzima. Todas las etapas se realizaron a 4°C.

Evaluación del pH óptimo: El pH óptimo de las amilasas procedentes de *H. hampei*, fue determinado con soluciones amortiguadoras 0.05M conteniendo 20 mM de $CaCl_2$ y 10mM de NaCl . Los buffers utilizados fueron: buffer citrato pH 3,0 y 5,0; buffer succínico pH 4,0 y 6,0; buffer fosfato pH 7,0; buffer tris-HCl pH 8,0 y buffer borato pH 9,0.

Prueba de estabilidad térmica: La estabilidad térmica de las amilasas fue determinada, preincubando la solución de la enzima en buffer de actividad durante 5 minutos a 25, 30, 40, 50, 60 y 70°C. Se tomaron cinco repeticiones de cada tratamiento.

Perfil isoenzimático: La actividad amilolítica se detectó en zimogramas *in situ* empleando el método de Campos *et al.* (1989). Muestras de la enzima se corrieron en geles nativos de poliacrilamida (PAGE) al 10%, utilizando una celda electroforetica (Bio-Rad laboratories, Modelo Miniprotean II). En los geles se adicionó almidón coopolimerizado a una concentración final del 0,5%. La electroforesis fue corrida a 100 voltios y a 4°C. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó con agua y se dejó en buffer de actividad por 2 horas a 30°C. Las bandas de actividad fueron detectadas por coloración del gel durante 15-20 minutos, con una solución de Iodo. Las zonas de actividad aparecen como bandas claras sobre un fondo azul oscuro. Finalmente el gel fue fotografiado y la imagen digitalizada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pH óptimo: Las amilasas de insectos son generalmente muy activas en rangos de pH ligeramente ácidos a neutros (Baker, 1983). En *H. hampei* los resultados muestran un mayor pico de actividad a pH 5,0 (Fig. 1), el cual se encuentra en el rango de 4,6 – 5,8 reportado para varios insectos del orden Coleoptera. Así por ejemplo, *Callosobruchus chinensis* tiene un pH óptimo de 5,2 a 5,4 (Podoler y Applebaum, 1971); pH 4,6 a 5,2 para *Tribolium castaneum* (Applebaum y Konijn, 1965); pH 5,8 para la amilasa de *Tenebrio molitor* (L) (Buonocore *et al.*, 1976); pH 6,5 a 7,0 en *Costelytra zealandica* (Biggs y McGregor, 1996) y pH 4,5 a 5,5 para *Sitophilus zeamais* y *Sitophilus granarius* (Baker, 1983). El pH óptimo para la actividad amilasa de *H. hampei*, determinado en presencia de Cloro y Calcio, muestra igualmente que la enzima es muy activa en un rango de 4,0 a 7,0, y que por fuera de estos valores su actividad disminuye considerablemente. Además, en todos los casos la enzima fue activida por Cloro y estabilizada por Calcio. Todas estas propiedades coinciden con aquellas típicas de las α-amilasas (Ming Shun Chen *et al.*, 1992).

Estabilidad térmica: La temperatura óptima de actividad de la enzima se observó a 40°C con una ligera disminución a 50°C. Después de los 50°C la actividad de la enzima disminuye notablemente, debido posiblemente a la desnaturalización de la enzima al ser sometida a altas temperaturas
(Fig. 2). En general la amilasa proveniente de *H. hampei* presenta buena estabilidad térmica en el rango comprendido entre 30 – 55°C, lo cual se atribuye a la presencia de Calcio en los buffers de actividad, debido a que las amilasas son metaloenzimas que requieren Calcio para la actividad catalítica (Robyt y Whelan, 1968). La incubación de la amilasa de *H. hampei* por más de 5 minutos a 70°C conlleva a la pérdida completa de la actividad enzimática. Igual resultado fue encontrado con amilasas de *S. zeamais y S. Granarius* (Baker, 1983). Las enzimas tienen diferente energía de activación y de conversión por lo tanto una modificación en la temperatura puede ocasionar un cambio en una de ellas (Lee y Anstee, 1995).

Figura 1. Efecto del pH sobre la hidrólisis del almidón a 30°C por amilasas de *Hypothenemus hampei.*

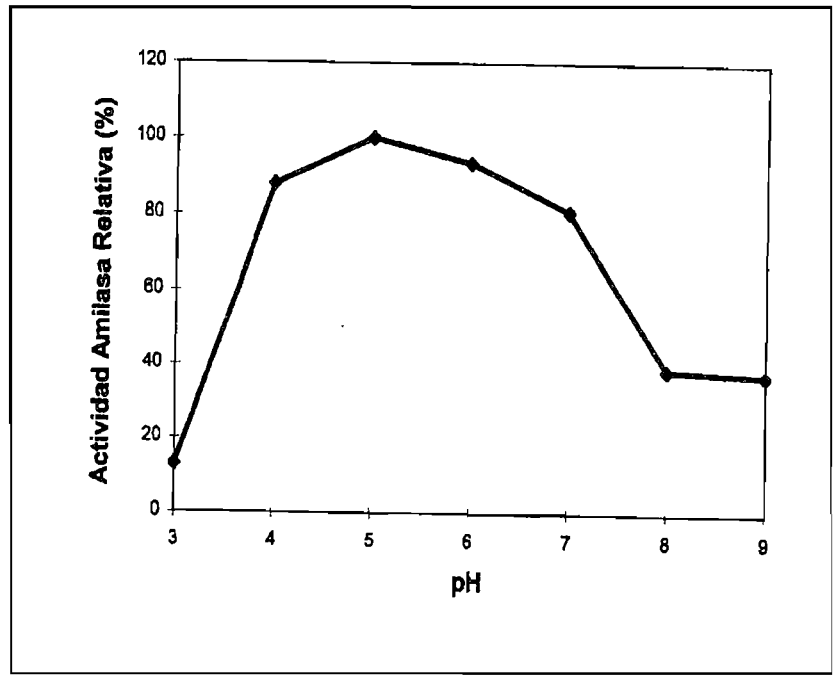
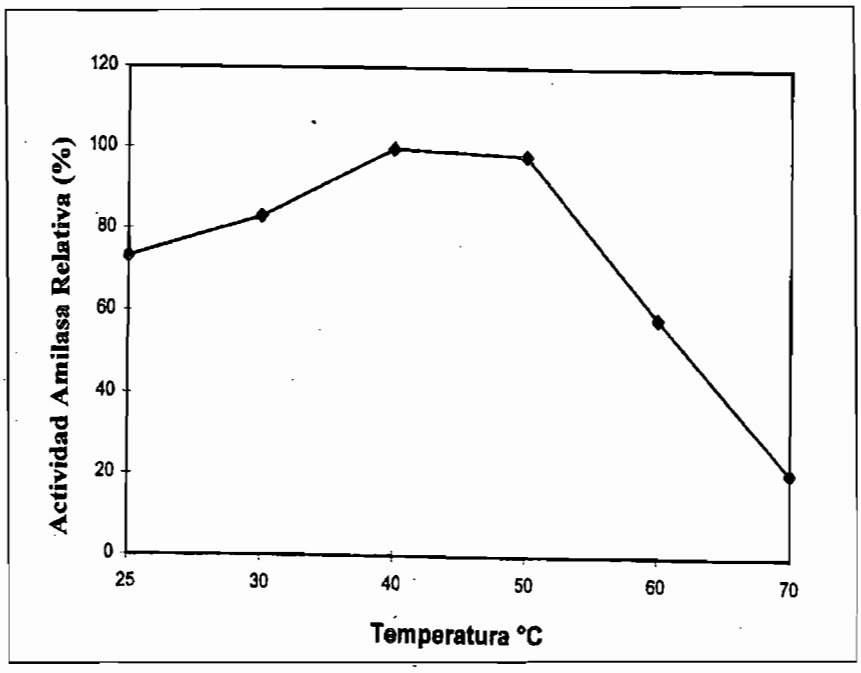


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa de *Hypothenemus hampei*



Zimograma de actividad:

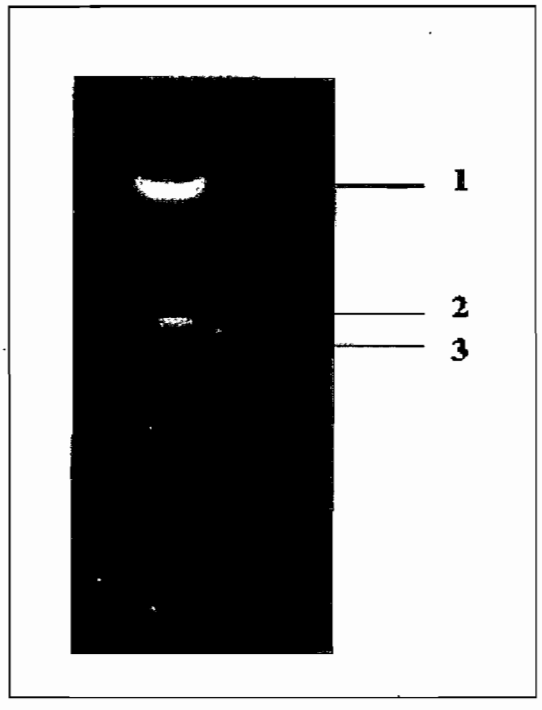
El análisis isoenzimático realizado para el extracto de adultos de *H. hampei* (Fig. 3), mostró 3 bandas de actividad amilasa una de las cuales representa más del 80% del total de la actividad enzimática. Esto indica que es posible purificar y caracterizar esta enzima con miras a desarrollar estrategias que permitan evaluar posibles inhibidores, los cuales pueden ser incorporados en la planta de café y obtener de esta forma resistencia a *H. hampei.*

Similares resultados se encontraron en *S. zeamais* el cual presenta dos isoenzimas de amilasas en geles de poliacrilamida del 7.5 %. Mientras que las amilasas de *H. hampei* bajo estas condiciones son fuertemente catiónicas, las de *S. zeamais* se movieron cerca del frente de corrida indicando su naturaleza aniónica (Baker, 1983). La presencia de un número mayor de pequeñas bandas de actividad cerca de las bandas principales, puede ser el resultado de artefactos (Doane, 1967). Dos de estas bandas fueron encontradas igualmente en extractos de intestinos, lo cual evidencia que estas bandas corresponden a amilasas intestinales (**Imagen no mostrada**).

Terra *et al.*,1985 mostró que esencialmente toda la actividad de las α-amilasas en *T. molitor* están asociadas con el tracto digestivo (80% con el intestino medio y 20% con el intestino anterior). Sin embargo, Silva y Terra, (1994), en trabajos posteriores demostraron que la actividad de estas enzimas se inicia cuando los insectos sienten hambre y se incrementa con el consumo del alimento por el insecto. A pesar de los estudios con homogeneizados de insectos, larvas o bien con los intestinos, el conocimiento de la distribución espacial de la digestión en insectos se limita al conocimiento de las zonas en las cuales ocurre (Vázquez, 1997), quedando la necesidad de aislar y caracterizar enzimas digestivas de glándulas salivales, buche y espacios luminares fuera y dentro de la membrana peritrófica que envuelve el alimento en el intestino medio, así como identificar los mecanismos amortiguadores de pH que pueden afectar la digestión.

El conocimiento generado en esta investigación es muy importante ya que nos permite conocer las principales propiedades de las amilasas de la broca del café, a la vez que posibilita la evaluación de potenciales inhibidores proteicos con actividad específica hacía α-amilasas provenientes de la broca del café, tal como lo reportan Ishimoto y Kitamura, 1988 quienes encontraron que los inhibidores de α -amilasas son los responsables de la protección de *P. vulgaris* al ataque de *Callosobruchus chinensis*. Al igual, una alta toxicidad del inhibidor, puede causar la muerte a las larvas cuando estas se alimentan de dietas artificiales conteniendo este inhibidor.

Figura 3. Zimograma de actividad amilasa de *Hypothenemus hampei* en gel de electroforesis nativo del 10 %. Después de la electroforesis, el gel fue incubado en buffer citrato 0.05M pH 5,0 conteniendo 10mM de NaCl y 20mM de $CaCl_2$ por 120 minutos a 30°C. Tinción con solución de Iodo. Las zonas claras indican bandas de actividad enzimática.



AGRADECIMIENTOS

Los autores del artículo agradecen ampliamente a Colciencias, a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y a la Universidad de Caldas, Colombia por el gran apoyo financiero para la ejecución de este trabajo.

LITERATURA CITADA

APPLEBAUM, S.W. 1964. The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase. Journal of Insect Physiology 10: 897-906.

APPLEBAUM, S.W.; KONIJN, A.M. 1965. The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. Journal of Nutrition 85: 275-282.

APPLEBAUM, S.W. 1985. Biochemistry of digestion. *In*: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. eds. Comprehensive and Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford Pergamon Press, Vol 7. P. 279-311..

BAKER, J.E. 1983. Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*. Insect Biochemistry 13: 421-428.

BAKER, J.E. 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus orizae* (Coleoptera: Curculionidae), by high-performance liquid chromatography and their interaction whith partially-purified amylase inhibitors from wheat. Insect Biochemistry 17(1): 37-44.

BAKER, J.E. 1991. Purification and partial characterization of ∝- amylase allosymes from the leeser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. Insect Biochemistry 21(3): 303-311.

BIGGGS D.R.; McGREGOR P. G. 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae as a basis for selecting inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26(1): 69-75.

BLANCO L., A.; MARTINEZ G., A.; SANDOVAL C., A.; DELANO F., J. 1996. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* (Herbst). Insect Biochemistry and Molecular Biology 26(1): 95-100.

BOHINSKI, R.C. 1983. Modern concepts in biochemistry. 4. ed. Estados Unidos, Allen and Bacon, 320p.

BUONOCORE, V.; POERIO, E.; SILANO, V.; TOMASI, M. 1976. Physical and catalytic properties of ∝-amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. Biochemistry Journal 153: 621-625.

CAMPOS, F. A.P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C.P.; ARY, M.B. 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and ∝-amilases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F). Comparative Biochemistry and Physiology 92B: 51-57.

DOANE W. W. 1967. Quantitation of amylases in *Drosophila* separated by acrylamide gel electrophoresis. Journal of Experimental Zoology 164: 363-378.

HOPKINS, R.H.; BIRD, R. 1954. Action of alpha amilasa on amylase. Biochemistry 56: 86-96.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. 1988. Identification of the growth inhibitor on azuki bean weevil in kedney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Japanese Journal of Breeding 38: 367-370.

KRISHNA, S.S. 1955. Physiology of digestion in *Trogoderma* larva. Journal of the Zoological Society of India 7: 170-176.

KRISHNA, S.S; SAXENA, N.K. 1962. Digestion and absorption on food in *Tribolium castaneum* (Herbst). Physiological Zoology 35: 66-78.

LEE, M.J.; ANSTEE, J.H. 1995. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with and extended binding site. Insect Biochemistry and Molecular Biology 25(1): 49-61.

LEMOS, F. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER FILHO, I. 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera:Bruchidae) reared in Cowpea (*Vigna ungiculata* (L.) Walp.) seeds. Entomologia Experimentalis et Applicata 56: 219-227.

MING-SHUN CHEN; GUOHUA FENG; ZEN, K.C.; RICHARDSON, M.; RODRIGUEZ V, S.; REECK R, R.; KRAMER J, K. 1992. α -amylases from three species of stored grain Coleoptera and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 22(3): 261-268.

PODOLER, H.; APPLEBAUM, S. W. 1971. The α amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*: properties. Biochemistry Journal 121: 321-325.

ROBYT J. F.; WHELAN W. J. 1968.The α amylases. In: RADLEY, J. A. ed. Starch and its Derivatives. London, Chapman & Hall, P. 430-476

SANDOVAL, C., M.L. 1991. Purificación y caracterización de enzimas larvales de cuatro insectos que atacan al maíz durante su almacenamiento. Irapuato, CIEIAA, Universidad de Guanajuato, 135p. (Tesis Licenciatura)

SILANO, V.; FURIA, M.; GIANFREDA, E.; MARCI, A.; PALESCANDOLO, R.; RAB, A.; SCARDI, V.; STELLA, E.; VALFRE, F. 1975. Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. Acta Biochimica et Biophysica 39: 170–178.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R. 1994. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera:Pyrrhocoridae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 24(5): 493-505.

TERRA, W.R.; FERREIRA,C.; BASTOS, F. 1985. Phylogenetic considerations of insect digestion. Disaccharidases and spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. Insect Biochemistry 15: 443-449.

TERRA, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects.Annual Review of Entomology 35: 181-200.

VAZQUEZ A., M. 1997. Anatomical, enzymatic, and microbiological studies on the digestive system of *Prostephanus truncatus* (Horn). Leicester, University of Leicester, 150p. Tesis: Doctor of Philosophy.

YETTER M. A.; SAUNDERS R. M.; BOLES H.P. 1979. α amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects. Cereal Chemistry 56: 243-244.

ATRATIVIDADE DE FRUTOS À BROCA-DO-CAFÉ, *hypothenemus hampei* (FERRARI): ESTÍMULOS VISUAIS E OLFATIVOS.

Jorge Rafael Mendoza (INIAP-EQUADOR), José Oscar Gomes de Lima(UENF-RJ), Evaldo Ferreira Vilela(UFV) & César José Fanton(EMCAPA-ES)

Depto. Biologia Animal/ UFV, Viçosa, MG, 36571-000

INTRODUÇÃO

A broca do café, *hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolydae) é a praga mais importante do cafeeiro em diversos países produtores, atacando os frutos em todos os estágios de maturação, causando perdas significativas no campo e no armazenamento. Os estudos sobre essa praga tem se concentrado em sua biologia, ecologia e controle. Contudo, os fatores de atratividade da broca para os frutos não estão completamente elucidados. O presente trabalho busca esclarecer o papel de estímulos visuais e olfativos na atração da broca para os frutos de café.

MATERIAL E MÉTODOS

Bioensaio 1- Preferência da broca-do-café por frutos em diferentes estágios de maturação - Frutos de coloração verde, amarela, vermelha e preta suspensos em alfinetes e fixos em placa de isopor foram confimados com uma fêmea da broca em um copo plástico transparente de 200ml, e a preferência da broca verificada após 24 horas. Foram testadas 100 repetições e os resultados comparados pelo teste do Qui-quadrado.

Bioensaio 2- Preferência da broca-do-café por frutos simulados de diferentes cores - Os frutos simulados constituíam-se de esferas coloridas de isopor de 20 mm de diâmetro nas cores verde, amarela, vermelha e preta. A avaliação da preferência e análise dos dados seguiram o mesmo procedimento do bioensaio 1.

Bioensaio 3- Resposta da broca-do-café a componentes voláteis em olfatômetro - Para verificar a resposta da broca a odores provenientes do fruto, utilizou-se olfatômetro e método descrito por Moeck(1970), em que o ar insulflado passa por um erlenmeyer com água destilada, sendo limpo e umidificado. Passa a seguir por uma câmara que contém o material que se quer testar e será a fonte de odor para a broca colocada em uma arena. Cada inseto foi testado por três vezes consecutivas e então descartado. A resposta foi considerada positiva sempre que o inseto cessava a locomoção ao interceptar o fluxo de odor, prosseguindo a seguir em direção à fonte; a resposta era considerada não positiva quando o inseto caminhava em direção à luz ou movimentava-se ao acaso dentro da arena. s resultados foram comparados pelo teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS

Foi comprovada a preferência da broca-do-café pelas cores preta e vermelha, tanto em frutos como simulados em comparação coma s cores amarela e verde (**Tabela 1**). A resposta olfativa a componentes voláteis produzidos por frutos de café indica que as brocas são mais atraídas por frutos maduros, tantos sadios com brocados, do que por frutos verdes (**Tabela 2**).

Tabela 1 – Preferência da broca-do-café por frutos de café naturais e simulados		
Cor	Broca por fruto(%)	
	Naturais	Simulados
Verde	14,29 b	16,13 b
Amarela	14,29 b	16,13 b
Vermelha	31,63 a	27,96 ab
Preta	39,79 a	39,78 a

1) Em relação a 98 brocas em frutos naturais e 93 brocas em frutos simulados

2) Porcentagens seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade

Tabela 2- Resposta olfativa da broca-do-café a componentes voláteis dos frutos de café em olfatômetro		
Frutos	Número de brocas testadas	% de respostas
Maduros sadios	120	72,50 a
Maduros brocados	91	78,02 a
Verdes sadios	116	14,65 c
Verdes brocados	117	37,35 b

Porcentagens seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste do qui-quadrado a 5% de probabilidade

DISCUSSÃO

A atração da broca-do-café pelos frutos naturais pretos e vermelhos coincide com os encontrados por Ticheler (1963).A preferência pelos frutos simulados por esferas de isopor provam que o inseto é capaz de distinguir as cerejas pelo sentido visão, indicando que a cor é um fator responsável pela atração da broca a distância (Alonzo, 1984). Os estímulos olfativos do fruto que podem estar associados a esse mecanismo de seleção foram testados no bioensaio com uso de olfatômetro, que se mostrou eficiente na determinação da resposta da broca. Dos 444 insetos testados, 207 foram atraídos pelo fluxo provinientes dos frutos.

A resposta aos frutos maduros (sadios ou brocados) foi significativamente superior à estimulada pelos frutos verdes (sadios ou brocados), o que indicaria que fatores aromáticos associados à maturação dos frutos envolvidos na atração da broca para alimentação e oviposição (Alonzo, 1984). A localização e identificação de hospedeiros adequados à reprodução através de odores foi demonstrada para outro escolitídeo, *Hylurgopinus rufipes*, por Lanier (1983) e Swedenborg et al. (1988).

Comparadas as respostas a frutos sadios (maduros + verdes) e brocados (maduros + verdes) não se observou diferença significativa. No entanto, na comparação das respostas a frutos sadios ou brocados em cada grupo, maduros ou verdes, observou-se aumento da resposta estimulada pelos frutos brocados, particularmente os verdes, para as quais a diferença foi significativa. Possivelmente, o dano provocado nos frutos de café aumenta a liberação de compostos voláteis produzidos pelo hospedeiro, ou uma mistura de substância produzidas pelos hospedeiro e pelo inseto, aumentando a atratividade para seus conspecíficos, o que explicaria o comportamento de agregação da broca por Baker(1984).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonzo, F.R. 1984. Aspectos ecológicos de la broca *Hypothenemus hampet* (Scolytidae:Coleoptera). In: El problema de la broca *(Hypothenemus hampei* Ferr.)(Col.: Scolytidae) y la caficultura. San Jose, Costa Rica, IICA- PROMECAFE. p. 7 1-136.

Baker, P. S. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in Southern Mexico (Coleoptera, Scolytidae). Folia Entomologica Mexicana, 61:9-24.

Lanier, G. N. 1983. Integration of visual stimuli, host odorants, and pheromones by bark beetles and weevils in locating and colonizing host trees. In: Herbivorous insects. New York, Academic Press, p. 161-171.

Moeck, H. A. 1970. An olfactometer for the bio-assay of attactants for scolytids. Canadian Entomologist, 102:792-796.

Swedenborg, P. D.; Jones, R L.; Ascerno, M. E. & Landwehr, V. R. 1988.
Hylurgopinus rufipes (Eichhoff) (Coleoptera: Scolytidae): Attraction to broodwood, host colonization behavior and seasonal activity in Central Mennesota. Canadian Entomologist, 120:1041-1050.

Ticheler, J. H. G. 1963. Estudio analitico de la epidemiologia del escolitideo de los granos de cafe *Stephanoderes hampel,* Ferr., en Costa de Marfil. Cenicafe, 14:223-294.

AVANÇOS NAS TÉCNICAS PARA CRIAÇÃO MASSAL DO PARASITÓIDE *Cephalonomia stephanoderis* HYMENOPTERA:BETHYLIDAE) SOBRE *Hypothenemus hampei* (COLEOPTERA:SCOLYTIDAE) MULTIPLICADA EM DIETA ARTIFICIAL.

Amador Villacorta & Sônia M. Torrecillas

Iapar, Cx. Postal 481. 86.001-970 - Londrina-Pr.

INTRODUÇÃO

A criação massal do parasitóide Cephalonomia stephanoderis (Hymenoptera:Bethylidae) é normalmente feita utilizando seu hospedeiro, a broca do café Hypothenemus hampei (Coleoptera:Scolytidae). Num sistema de produção é utilizando os frutos de café broqueados (Barrera, 1994), e no outro sistema o café pergaminho é realizado infestando artificialmente com broca (Benavides & Portilla, 1990, Portilla & Bustillo, 1995). Os problemas básicos apresentados por ambos os métodos são seu alto custo e a sua dependência de frutos broqueados coletados no campo, o qual não está disponível todo o ano próximo da unidade de criação. Consequentemente, a criação da broca em dieta artificial seria aparentemente a solução para este problema. A primeira dieta artificial para broca foi publicada por Villacorta (1985), a qual foi modificada para uma dieta comercial publicada por Villacorta & Barrera,1993, Villacorta & Barrera, 1996, e uma outra dieta está sendo utilizada para criação da broca para a produção de C. stephanoderis na Colômbia (Portilla 1999). Neste artigo descreveu os conceitos e metodologia da técnica de criação de H. hampei e seu parasitóide e também como se pretende instalar a planta piloto de produção massal de C. stephanoderis no Brasil, com base nos avanços realizados em outros países da América Latina.

DIETA ARTIFICIAL PARA *H. hampei*

Basicamente todas as dietas de broca publicadas contem os seguintes ingredientes: agar, caseína, levedo, açúcar, café cru moído e agentes antioxidantes e antimicrobianos. A dieta que usamos no Brasil é a publicada por Villacorta & Barrera (1996) e que originalmente foi denominada ECOBROVILL-160 que tem os seguintes ingredientes: agar 21g, café cru moído 100g, caseína 20g, açúcar 14g, levedo de torula 20g, nipagin 1g, sorbato de potássio 0.6g, etanol 10 ml, formaldeido 2 ml e água 700 ml. Os custos dos ingredientes da dieta de broca para produzir um litro de dieta variam grandemente de país para país, assim temos os custos de 8 dólares no México a 1.5 dólares na Colômbia, isto devido ao fato de que alguns dos ingredientes tem que ser importados. Um ingrediente que aumenta grandemente os custos é o Agar mas se seguirmos a sugestão de Portilla (1999) de usar Agar industrial ao invés de Agar bacteriológico os custos podem cair mais de 40%. É necessário mais pesquisas em relação aos requerimentos nutricionais da broca do café, e sobre a relação simbiótica microorganismos – broca do café, tal como foi sugerida a existência de uma simbiose entre a broca e o fungo Trichoderma sp por Villacorta, (1989), que foi reforçada nas publicações de desenvolvimento de dietas de brocas em Villacorta & Barrera, (1996) e Rojas et al (1999) que consideraram *Fusarium solani* como um simbionte da broca.

INFESTAÇÃO DA DIETA

As brocas utilizadas no início da criação das brocas em dieta artificial são procedentes de frutos atacados no campo. Sendo que os frutos são esterilizados usando 2% de Formaldeido (37%), seguido de um banho em água destilada esterilizada. Dos frutos se obtém prepupas, pupas e fêmeas ativas. Este material biológico deve passar por uma esterilização de acordo com Villacorta & Barrera (1993). É recomendado usar um macho para cada nove fêmeas para assegurar a plena fecundação das fêmeas.

PRODUÇÃO DAS BROCAS

Os tubos de vidro (1.7 x 7 cm fundo chato) com dieta infestadas com broca, são mantidos em salas com temperatura de 26 ±2°C e 60±5% U.R. e em condições de completa escuridão; 80 a 90 dias após a infestação da dieta os tubos são abertos e com um toque na base dos tubos os pellets da dieta caem. Todo o conteúdo dos tubos é colocado no topo de um aparelho formado por uma série de peneiras e por agitação mecânica, podem ser separados: os pellets da dieta, diferentes estágios de desenvolvimento da broca,

um pó fino com presença de ovos, larvas, prepupas e pupas. Os adultos ativos, após uma esterilização por superfície são usados para infestar novos tubos com dieta. Após 85-90 dias de infestação da dieta, os tubos contém entre 250 a 300 indivíduos por tubo, contando todos os estágios de desenvolvimento. Consequentemente, de 245 tubos de cada receita da dieta, é possível produzir entre 36.250 - 43.500 brocas. Considerando que cada receita de dieta custa 8 dólares no México, o custo para produzir 1.000 brocas pode ser estimado entre 0.20 a 0.25 dólares.

CRIAÇÃO DE C. STEPHANODERIS USANDO BROCAS MULTIPLICADAS EM DIETA ARTIFICIAL

Aos 85-90 dias após a infestação das dietas com brocas, o número de prépupas e pupas de broca, é de 45 a 80 indivíduos aptos para oviposição por parasitóides. Considerando que tubos infestados com brocas aos 85-90 dias é o momento ideal para a criação dos parasitóides, é proposto dois métodos (i) criação "in vitro" no qual são usados as prépupas e pupas da broca separadas da dieta durante o processo de tamizagem (ii) o uso dos pellets que contém em seu interior diferentes estágios de desenvolvimento da broca. Ambos métodos são descritos a seguir.

Criação "in vitro"

Utilizando as peneiras é possível separar 50% das prépupas e pupas das dietas, dando lugar a 28 a 40 indivíduos por tubo, os quais podem ser usados para a criação dos parasitóides. A criação consiste na impregnação da superfície de uma cartela de papel corrugado (10.5 x 9.5 cm) com goma arábica diluída em água, que em seguida é recoberta por uma cobertura de pó fino de semente de café. Na base da canaleta do papel corrugado são depositadas as pupas, prépupas, larvas e ovos da broca. E, em seguida são colocadas em uma caixa plástica de 11 x 10 x 5 cm, com uma abertura na tampa de 5 x 5 cm, coberta com uma tela fina. Em cada caixa plástica são colocados entre 25 a 30 parasitóides e mantidos em uma sala com 27±2°C e 75±5% U.R. Após 10 dias pode-se observar a formação de casulos agrupados a um dos extremos da canaleta, isto por causa do comportamento maternal do parasitóide.

CRIAÇÃO NOS PELLETS DE DIETA

Os pellets são infestados na proporção de dois parasitóides por pellets. Os pellets de dieta são colocados em caixas de plástico redondas com um diâmetro de 22 cm e 10 cm de altura com uma abertura na tampa, coberta por uma tela fina. O material é colocado em um quarto de criação com 27± 2°C e 75 (5% U.R. De 17 dias em diante a nova geração de parasitóides inicia sua emergência. Usando 140 pellets (um litro de dieta) é possível obter entre 2.800 a 3.000 parasitóides .

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As técnicas descritas neste artigo objetivam a máxima utilização do material biológico da broca produzido em dietas artificiais. Para criação em dieta oferece as seguintes vantagens:
(i) permite manter uma população de brocas e parasitóides durante o período de entressafra;
(ii) tem grande valor para os trabalhos de pesquisa para o estudo da biologia e comportamento da broca e seu parasitóide,
(iii) permite produzir um pequeno número de parasitóides para liberações em campo; para (iv) permite manter brocas durante a entressafra os quais podem ser usados na criação de brocas em café pergaminho; para (v) abre o caminho para pensar em um processo industrial na criação dos parasitóides.
É necessária pesquisa no desenvolvimento de métodos de automação na preparação da dieta, na distribuição da dieta nos tubos, perfuração da dieta e fechamento dos tubos. Isto pode reduzir os custos de produção e levarnos a uma criação comercial de C. stephanoderis, o qual nos permitiria a integração desta técnica no manejo integrado da broca, com base em liberações inundativas deste parasitóide.

LITERATURA CITADA

Barrera, J.F. 1994. Dynamique des populations du scolyte des fruits du caféir, Hypothenemus hampei (Coleoptera:Scolytidae), et lutte biologique avec la parasitoide Cephalonomia stephanoderis (Hymenopetra:Bethylidae) au Chiapas, Mexique. Thesis. Université Paul Sabatier, France, 301 pp.

Benavides, G.M. & . M. Portilla. 1990. Uso del cafe pergamino para la cria de Hypothenemus hampei y de su parasitoide

Cephalonomia stephanoderis en Colombia, Cenicafe (Colombia) 41:114-116.

Portilla, M. & A Bustillo. 1995. Nuevas investigaciones en la cria masiva de Hypothenemus hampei y de sus parasitoides Cephalonomia stephanoderis y Prorops nasuta. Revista Colombiana de Entomologia 21(1):25-33.

Portilla, M. 1999. Mass production of Cephalonomia stephanoderis on Hypothenemus hampei reared using artificial diet. Thesis. University of London, England. 253 pp.

Rojas, M.G., J.A Morales-Ramos & T. C. Harrington. 1999. Association between Hypothenemus hampei (Cleoptera :Scolytidae) and Fusarium solani(Moniliales: Tuberculariacea). Ann. Entomol. Soc. Am. 92(1):98-100.

Villacorta, A 1989. Aspectos nutricionales de la cria de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). III Taller regional de broca, Antigua, Guatemala, Abril 3-7, 1989. IICA-PROMECAFE. 181-186.

Villacorta, A. 1985. Dieta meridica para criação de sucessivas gerações de Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867)(Coleoptera:Scolytidae). An. Soc. Entomol. Brasil. 14:315-319.

Villacorta, A. & J. F. Barrera, 1993. Nova dieta meridica para criação de Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera:Scolytidae). An. Soc. Entomol. Brasil. 22:405-409.

Villacorta, A. & J.F. Barrera. 1996. Techniques for mass rearing of the parasitoid Cephalonomia stephanoderis (Hymenoptera:Betylidae) on Hypothenemus hampei (Coleoptera:scolytidae) using an artificial diet. Vedalia 3:45-48.

Liderando a evolução tecnológica em equipamentos para a cafeicultura.

PINHALENSE

Pinhalense S/A Máquinas Agrícolas

www.pinhalense.com.br

EXPERIÊNCIA BRASILEIRA NA VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE SUBPRODUTOS DA AGROINDUSTRIA DO CAFÉ

Carlos Ricardo Soccol[1], Fan Leifa[1], Adenise L. Woiciechowski[1], Debora Brand[1], Cristina M. M. Machado[1], Marlene Soares[1] ,Pierre Christen[2] Ashok Pandey[1].

[1]Laboratório de Processos Biotecnológicos- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), CEP 81531-970 Curitiba- PR- Brazil.
[2]Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence (CESB/ESIL)-13288, Marseille - France

INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor, consumidor e exportador mundial de café , com uma produção anual de cerca de 30.5 milhões de sacas, das quais 26 milhões de café arábica e 4.5 milhões de café robusta, segundo dados da Associação Brasileira dos Exportadores de Café (Abecafé). Dessa produção, 90% do café produzido atualmente utiliza a técnica de descasque por via seca. O café colhido é lavado, de forma similar à que é feita na via úmida. Depois da lavagem, resultam duas frações : o café chamado "bóia" e o café chamado miúdo. As duas frações serão secas separadamente.

O processo de secagem pode ser natural ou artificial. Na secagem natural, a mais utilizada, os grãos de café são transportados para uma superfície plana de terra, asfalto ou tijolo de argila e são secos até que a umidade dos grãos fiquem com cerca de 11-12%. Pelo processo de secagem artificial, os grãos são secos com convecção forçada, até o mesmo teor de umidade.

Depois da secagem, o café vai à uma etapa de limpeza, na qual os grãos são separados de impurezas (pedras,terra, folhas, restos de galhos, etc.) através de peneiras vibratórias.

O café limpo sofre então o descasque, que separa as cascas para a parte de fora da máquina. O café descascado é selecionado, embalado e enviado para industrias de torrefação e de fabricação de café solúvel.

Considerando que a casca constitui cerca de 50% do grão seco, grandes volumes são gerados anualmente no país.

Outro problema que deveremos enfrentar em breve em nosso país, trata do destino que deveremos dar aos resíduos líquidos e sólidos gerados no processo por via úmida, que começam a ser implantados no país como forma de atender a demanda internacional crescente por cafés finos de alta qualidade. Isso irá levar a uma aumento significativo dos problemas ambientais ocasionado por grandes volumes de H_2O de lavagem e polpa úmida.

A técnica da cultura do café adensado práticada em muitas lavouras no estado do Paraná como forma de aumentar a produtividade e reduzir as perdas ocasionadas pelas geadas, tem levado a biomassa foliar extremamente importante o que vem dificultando a colheita das cereja que caem no solo durante a colheita.

Desta forma esse esta palestra busca apresentar algumas alternativas biotecnológicas desenvolvidas pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR para o manejo desses resíduos, pois os mesmos apresentam elevado potencial para uso na alimentação animal ou para uso como substrato na obtenção de produtos e biomoléculas de elevado valor agregado (Soccol & Krieger, 1998). No caso do uso desses resíduos agro-industriais na alimentação animal é de fundamental importância que seja estudado o problema da eliminação dos compostos recalcitrantes tóxicos (CRT) tais como cafeína, taninos e polifenóis. Atualmente os compostos recalcitrantes tóxicos representam uma grande limitação no uso da polpa , casca do café e mesmo folhas na alimentação animal, embora tais resíduos possuam um valor calórico-protéico considerável (11.3 % proteína bruta ; 2.0% de matéria graxa ; 27.6% de celulose ; 20% de matérias pécticas e açucares redutores, (TANGO, 1971 : VASCO, 1989).

Além da eliminação dos fatores anti-nutricionais com vistas a sua utilização na alimentação de ruminantes, aves e peixes estaremos também realizados estudos com objetivo de utilizar esses sub-produtos como substrato de fermentação para produção de fungos comestíveis e biomoléculas de interesse comercial tais como ácidos orgânicos, hormônios vegetais e aromas.

PRODUÇÃO DE FUNGOS COMESTÍVEIS

a) Pleurotus: Estudos foram realizados visando utilizar cascas, folhas e borra de café na produção de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus*. Inicialmente 10 diferentes cepas de fungos do gênero *Pleurotus* pertencentes ao Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR foram testadas em um meio de cultivo a base agar extrato de casca de café. Os estudos de seleção de cepas foram realizados em função da velocidade

de crescimento radial e da formação de biomassa de acordo com técnica descrita por Soccol (1994).

A cepa *Pleurotus ostreatus* LPB 09 foi selecionada para estudos posteriores de frutificação por apresentar o melhor crescimento em agar casca de café (9,68 mm/dia e 43,40 mg/placa em 9 dias de cultura a 24 °C.

Quando somente casca de café foi usada como substrato o rendimento de produção foi de 968g/Kg de casca de café seco, sendo que os primeiros corpos de frutificação foram colhidos após 20 de cultura.

Rendimentos elevados na produção de fungos comestívies foram também obtidos utilizando borra de café como substrato na (903.5g/Kg de casca de café seco). Os resultados demostraram que o uso de folhas de café isoladamente como único substrato não é recomendável para a produção de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus*.

b) Lentinus edodes: Trabalho semelhante foi realizado com o fungo comestível *Lentinus edodes LPB 02* conforme técnica descrita anteriormente. A frutificação foi realizada em saco plástico utilizando 2 Kg de borra de café com 65% de umidade e inoculada com 15% de "spawn" produzido a partir de uma mistura de 80% de serragem de eucalipto e 20% de farelo de trigo. Os primeiros corpos de frutificação apareceram 60 dias após inoculação. A eficiência biológica após a terceira colheita foi de 886g de fungo fresco/Kg de borra de café fresco.

DETOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA CASCA DO CAFÉ

A casca de café apresenta um baixo valor nutricional, devido a presença de substâncias tóxicas como cafeína (1,2 %), taninos (6,3%) e polifenóis. Uma alternativa para a redução dessas substâncias tóxicas é a utilização da técnica da fermentação no estado sólido, empregando microorganismos selecionados capazes de utilizar a cafeína como fonte de nitrogênio. A fermentação no estado sólido é considerada a mais natural das fermentações, porque seus processos assemelham-se as condições sob as quais a maioria dos microrganismos crescem na natureza. É definida como o crescimento de microorganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, mas o substrato deve conter umidade suficiente, presente na forma absorvida dentro da matriz sólida.

O objetivo do presente trabalho foi incrementar o valor biológico da casca de café, pela detoxificação de seus componentes tóxicos por fungos filamentosos, utilizando a técnica de fermentação no estado sólido.

Os microorganismos foram selecionados com base na sua velocidade de crescimento radial e biomassa produzida em ágar extrato de casca de café (100g/L). Foram utilizadas onze cepas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e duas do gênero *Phanerochaetae*.

O crescimento radial em ágar extrato de casca de café foi realizado por meio de inoculação de uma solução de esporos dos microrganismos estudados no centro de uma placa de Petri. A biomassa foi medida através da dissolução do ágar e separação da biomassa, que foi então pesada em um papel de filtro previamente tarado.

Para o preparo do substrato (casca de café) para a detoxificação. Neste caso a casca de café foi inicialmente seca em estufa com circulação de ar à 55° C por 48 horas até atingir uma umidade de aproximadamente 8 %. Em seguida a casca foi moída e peneirada. Utilizou-se a fração com granulometrica compreendida entre 0,8 e 2,0 mm para os estudos de detoxificação. Os trabalhos de seleção em agar café demonstraram que os fungos do gênero *Rhizopus* são capazes de crescer muito bem neste tipo de substrato, pois a velocidade de crescimento radial das cepas estudadas variaram de 0.94 mm/h à 2.19 mm/h. A cepa *Rhizopus arrhizus* 16179 foi selecionada para os estudos posteriores por apresentar a maior produção de biomassa e velocidade de crescimento radial (2.03 mm/h e 12.10 mg/placa). A cepa *Phanerocaetae chrysosporium* BK foi também selecionada para detoxificação da casca do café.

As cepas *Rhizopus arrhizus* 16179 e *Phanerocaetae chrysosporium* BK foram selecionadas por serem capazes de degradar parcialmente os compostos tóxicos presentes na casca de café. Os testes deste estudo foram realizados sem a adição de nutrientes às cascas de café, o que significa que os microorganismos podem utilizar somente os componentes presentes no substrato para biotransforma-lo. Os resultados demostraram que a cepa de *Rhizopus arrhizus* 16179 em 6 dias de fermentação foi capaz de reduzir o teor de cafeina presente inicialmente na casca em 87% e em 65% a concentração de tanino. Os melhores resultados alcançados com a cepa de *Phanerocaetae chrisosporium* BK foi uma redução na concentração de cafeina de 71% e tanino de 45% em 16 dias de fermentação.

OBTENÇÃO DE SUBSTRATOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE DA CASCA DO CAFÉ.

A técnica da hidrólise ácida, alcalina ou enzimática tem sido mundialmente utilizada na obtenção de substratos fermenteciveis ricos em monossacarídeos. As hidrólises ácidas (cloridrica e sulfurica) e alcalina (NH_4OH, $(NH_4)_2SO_4$, Uréia e Na_2CO_3) foram realizadas em autoclave utilizando 200 g de cascas de café por litro de solução. Foram testadas temperaturas de 100, 120 e 140 °C por tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. Obtém-se desse tratamento uma fração líquida e uma sólida, as quais foram separadas por filtração. Como os açúcares redutores (simples) são solúveis em água, a fase líquida é rica em açúcares redutores, enquanto a sólida é mais pobre. Os açúcares redutores nas fases líquidas e sólida foram determinados pelos métodos colorimétricos de Somogyi-Nelson e D.N.S. Concentrações de açúcares redutores entre 30 e 50 g/L foram obtidas na fase líquida, sendo que o melhor resultado foi de 49,5 g/L nas frações em que foram utilizadas somente água e casca de café na temperatura de 100 °C por 60 minutos. A auto-hidrólise permitiu obter uma concentração de 247.5 gramas de açucares redutores em glicose (ARG) por kg de casca de café seca. Esse resultado representa uma recuperação de 98% dos ARG presentes na casca do café, utilizando apenas água , baixa temperatura (96°) e pressão atmosférica.

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *Ceratocystis fimbriata* EM RESÍDUO SÓLIDO DA AGROINDÚSTRIA DO CAFÉ

Apesar da maioria dos aromatizantes serem atualmente obtidos por síntese química(84%), pesquisas mostram a crescente preferência dos consumidores por alimentos naturais ou que contenham aditivos naturais (Janssens et al. 1992). Plantas continuam sendo importantes fontes de óleos essenciais e aromas, mas há grande dependência em fatores de difícil controle, como clima e doenças. Uma alternativa à síntese de aromas naturais baseia-se nos processos microbiológicos, como fermentações (biosíntese) e bioconversões. O custo de produção de tais aromas pode ser questionado; contudo, o preço de mercado pago por aromas naturais é compensador. Por exemplo, a 4-decalactona sintética (aroma de impacto em pêssegos) custa 150 dólares/ Kg, enquanto seu similar natural custa 6000 dólares/ Kg(4). Fungos do gênero *Ceratocystis* sintetizam diferentes aromas frutais/florais (pêssego, abacaxi, banana, cítricos e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo, sendo que *C. fimbriata* é interessante devido ao seu rápido crescimento, habilidade na produção de esporos e à variedade de aromas sintetizados (Senemaud, 1988). Neste trabalho, procedeu-se a fermentação no estado sólido da casca de café com o intuito de avaliar a produção de aromas por *C. fimbriata*, comparando os resultados com outros mencionados para diferentes resíduos agroindustriais. A influência da adição de glicose e o uso de substâncias precursoras de aromas foram estudados. Os compostos biosintetizados presentes no headspace dos cultivos foram caracterizados e quantificados.

Procedimentos de fermentação: Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250mL, contendo 15g de matéria seca (MS) e cobertos com 8 camadas de gaze. Em todos os experimentos as condições iniciais foram: temperatura 30°C, pH 6, inóculo $1x10^{-7}$ esporos g^{-1} MS e 70% de água (máxima absorção do substrato)(1;3). A influência da adição de glicose (20%, 35% e 46%) e da adição de possíveis precursores (leucina 10 mMol (2), óleo de soja 10%(1) e solução salina(2)) foram estudadas para otimização da produção de voláteis totais (VT).

Procedimentos analíticos: Cada experimento foi realizado em triplicata. O acompanhamento da evolução da produção dos voláteis foi realizada através de avaliações sensoriais paralelamente à análise por Cromatografia de Gases (CG).

Os aromas frutais de banana , abacaxi e macã foram produzidos durante o cultivo de *Ceratocystis fimbriata* em casca de café. Ficou caracterizado que a biosíntese de ésteres, como : isoamil acetato, etil acetato, isobutil acetato formam aroma de banana), etil isobutirato e etil butirato dão origem aos aromas de maçã e morango.

A análise por Cromatografia de Gases permitiu a identificação de diversos compostos, como indicado na **Tabela 1**, que apresenta os dados integrados para cada composto presente no headspace dos cultivos. A adição de leucina aumenta a produção de ésteres derivados do metabolismo deste aminoácido. Todos os compostos já foram mencionados previamente por outros autores (Bramorski et al., 1998 ; Christen et al., 1991 ; Christen et al., 1997).

Tabela 1: Total individual dos voláteis medidos no headspace dos cultivos de *C. fimbriata* (dados integrados).

Compostos	20	35	35.O	35.L
Acetaldeído [a]	47	57	58	50
Etanol [a]	329	428	607	565
Isopropanol [a]	26	5	-	11
Etil acetato [b]	2078	1833	1841	2811
Etil isobutirato [b]	11	10	7	15
Isobutil acetato [b]	19	18	15	35
Etil butirato [b]	9	3	1	21
Propil acetato [b]	4	-	-	-
Isoamil acetato [b]	2	11	-	16
2- heptanona [b]	-	-	-	3
2-octanona [a]	52	67	3	30
Etil 3 hexenoato [b]	-	-	-	3

20: 20% glicose; 35: 35% glicose (controle); 35.L: com leucina; 35.O: com óleo de soja.
[a] expresso em equivalente de etanol mol / L gMS ;
[b] expresso em equivalente de etil acetato mol / L gMS.

O resíduo de casca de café tratada com vapor fluente é considerado um substrato adequado à produção de aromas por *C. fimbriata*. A adição de glicose é necessária à esta proposta e a concentração adequada compreende-se entre 20% e 35%. A adição de leucina aumentou em 58% a produção de compostos voláteis totais. Comparando os resultados com outros da literatura percebe-se que a produção total foi duas vezes superior aos melhores resultados obtidos com bagaço de mandioca, senso que este havia sido adicionado de solução de leucina 15 vezes mais concentrada (3). Contudo, os compostos identificados foram os mesmos em ambos trabalhos.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA3) A PARTIR DE CASCA DE CAFÉ

Ácido giberélico (GA_3) é um hormônio endógeno de plantas superiores e metabólito secundário de certos fungos. É um importante promotor e regulador do crescimento das plantas sendo utilizado na agricultura, viveiros, produção de flores, etc., para uma série de efeitos benéficos, como eliminação da dormência e aceleração de germinação em sementes, melhora no rendimento das colheitas, promoção da formação do fruto, indução do florescimento e outras. Nos últimos anos, este metabólito tem sido produzido industrialmente por fermentação submersa a um alto custo (US$ 1 a 3/grama, dependendo da pureza e potência), uma vez que o rendimento é muito baixo e sua extração difícil. A redução do mesmo levará suas diversas aplicações a uma utilização mais extensa, trazendo ótimos benefícios econômicas à agricultura e indústria. Uma possibilidade de diminuição dos custos está na pesquisa de novas técnicas de fermentação (Kumar e Lonsane, 1987, 1989; Brückner e Blechschmidt, 1991).

Recentemente, tem aumentado o interesse de cientistas no desenvolvimento de produção de giberelinas por fermentação no estado sólido (FES). Fermentação sobre farelo de trigo é descrita por Kumar e Lonsane (1987), que compararam o rendimento com a técnica submersa. Tal comparação também foi feita por Tomasini *et al.* (1997), utilizando-se como substratos farinha de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e poliuretano de baixa densidade. Ambos grupos obtiveram maior rendimento com a FES, no caso de Kumar e Lonsane de 1,6 vezes, e custo cerca de 2,5 vezes menor.

Este trabalho teve por objetivo determinar a possibilidade da utilização da casca do café como substrato de fermentação para produção de ácido giberélico. Para tanto foram utilizadas seis cepas de microrganismos produtoras de GA_3 em fermentação no estado sólido e submersa, comparando-se dessa forma, o rendimento dos métodos.

A **Tabela 2** mostra os resultados da seleção de cepas em casca de café tratada de 3 diferentes maneiras. O melhor resultado foi obtido com o resíduo sólido da extração da casca do café. Isso se dá, provavelmente, por existirem substâncias inibidoras do metabolismo de produção das giberelinas nos resíduos de café (casca e extrato), que com o pré-tratamento (hidrólise) são eliminadas.

O microrganismo que apresentou melhor produção foi a cepa LPB-06, para os três sistemas de fermentação. Dessa forma, a quantificação por HPLC foi feita para os fermentados por este microrganismo. Para os sistemas em FES, a cepa LPB-01 e LPB-03 também apresentaram bons resultados; já para FSm, a cepa

TABELA 2: Resultados da presença de GA_3 produzido por fermentação em cromatografia em camada delgada.

CEPA	FSm extrato De casca	FES casca de café	FES resíduo após extração
LPB-1	+++	++++	++++
LPB-2	++++	++	+++
LPB-3	++	+++	+++
LPB-4	+	+	++
LPB-5	+	+	++
LPB-6	++++	++++	+++++

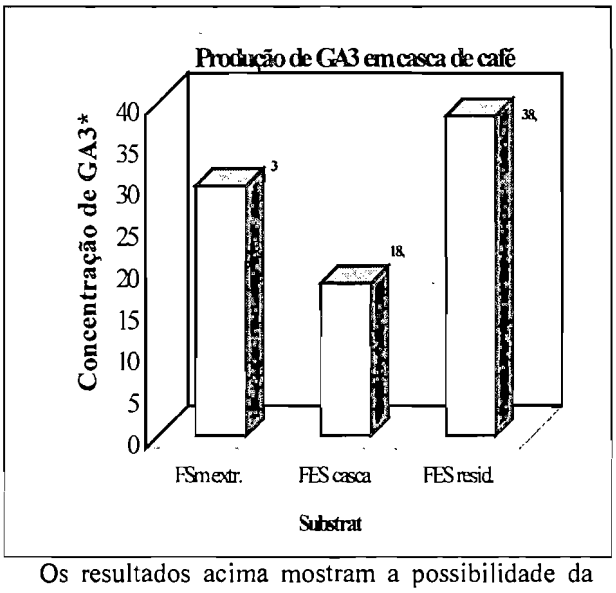
Onde: Maior número de "+" significa melhor fluorescência.

LPB-02 teve uma maior produção. As cepas LPB-04 e LPB-05 apresentaram uma baixa produção de GA_3 para todos os substratos.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os resultados da quantificação do GA_3 produzido por fermentação da cepa LPB-06, obtidos por HPLC estão apresentados na **Figura 1**, a seguir: Os valores de concentração são dados em *mg GA_3/L* substrato para FSm e em *mg GA_3/kg* substrato para FES.

FIGURA 1: Produção de GA_3 pela cepa LPB-06, em diferentes sistemas de fermentação com casca de café.



Os resultados acima mostram a possibilidade da utilização da casca de café como substrato para produção de GA_3 por fermentação no estado sólido, desde que feito um pré-tratamento do substrato.

Estudos complementares estão realizados com vistas a otimização das condições de tratamento do substrato e de fermentação quanto a parâmetros físicos e nutricionais, utilizando-se planejamento experimental com análise por superfície de resposta. Com estas otimizações espera-se aumentar a produção de ácido giberélico.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram as potencialidades para com o desenvolvimento de novas pesquisas que visam o aproveitamento dos resíduos sólidos (casca, borra, polpa e fôlhas) da agroindustria do café. Esses sub-produtos são ricos em moléculas orgânicas que poderão ser transformadas em produtos de valor comercial importante. Ressaltamos também que a valorização dos sub-produtos sólidos e líquidos da agro-industria do café é uma forma recomendável e moderna de proteção do meio ambiente, podendo propiciar ao produtor recursos financeiros complementares expressivos, sobretudo em períodos de baixa no preço do café.

AGRADECIMENTO

Carlos Ricardo Soccol agradece ao CNPq (bolsa produtividade em pesquisa) e a União Européia (projeto INCO DC: N°CT970185) pelo apoio financeiro recebido.

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

Bramorski, A. *Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindústriais*. Curitiba, 1997. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPr.

Brahan, J. E.; Bressani, R. *Pulpa de Café – composición, tecnologia y utilización*. Bogota: Instituto de Nutrición de Centro América y Panama, INCAP, 1978.

Brückne, B.; Blechschmidt, D. The Gibberellin Fermentation. *Critical Rewiews in Biotechnology*, 1991, 11(2), 163-192.

Christen, P et al. Biotechnology Letters, 1991, 20(4) : 359-362.

Christen, P et al. Biotechnology Letters, 1997, 101(8) : 911-919.

Kumar, P. K. R. & Lonsane, B. K. Gibberellic Acid by solid state fermentation: consistent and improvement yields. *Biotechnology and Bioengeneering*, 1987, 30, 267-271.

Janseens, L et al., *Process Biochemistry*, 27:195-215,1992.

Kumar, P. K. R. & Lonsane, B. K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 1989, 34, 29-139.

Hesseltine, C. W. Solid State Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1972, 14, 517-532.

Pandey, A. Recents process development in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 1992, 7, 109-117.

Senemaud, C. PhD Thesis, France,1998.

Soccol, C. R. *Contribuição ao estudo de fermentação no estado sólido em relação à produção do ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por Rhyzopus e basidiomicetos do gênero Pleurotus*. Curitiba, 1994. Tese (Professor titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) – UFPr.

Soccol, C. R & Krieger, N. *Advances in Buiotechnology*, Edited by Educational Publishers & Distributors, New Delhi, June-July, 1998, pag.25-40.

Sturza, R. *Aproveitamento biotecnológico dos resíduos da extração do suco da maçã por fermentação no estado sólido*. Curitiba, 1995. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPr .

Tomasini, A.; Fajardo, C.; Barrios-Gonzáles, J. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *Word Journal of Microbyology and Biotechnology*, 1997,1 3, 203-206.

EXPERIENCIA MEXICANA DE VALORIZACION BIOTECNOLOGICA DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA DEL CAFE

Saucedo-Castañeda G., Romano-Machado J.M. [1], Gutiérrez-Sánchez G., Delgado-Vidal F., Ramírez-Romero G. y Perraud-Gaime I. [2]

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ave. Michoacán y la Purísima, Iztapalapa, C.P. 09340, A.P. 55 535, México D.F. Email:saucedo@xanum.uam.mx
[1] ICIDCA, Via Blanca 804, A.P. 4026, Ciudad Habana, Cuba
[2]IRD-México, Cicerón 609, Los Morales, C.P. 11530, México, D.F.

RESUMEN

La utilización de los subproductos de café representa un reto importante para la integración del proceso húmedo del café en México, si son manejados adecuadamente puede representar beneficios económicos importantes.

En los meses de recolección de la cereza del café, la atención está orientada hacia el beneficio del café y el manejo de subproductos puede ser problemático. En el ciclo de 1997-98 se produjeron en México cerca de 4.8 millones de sacos de 60 kg de café verde. La pulpa y el mucilago pueden llegar a representar hasta el 50% del café cereza, de donde se puede concluir que el volumen de subproductos es enorme. Con el objetivo de estabilizar la pulpa y conservar su valor nutricional, proponemos la realización de ensilaje bajo condiciones controladas. En esta etapa se pueden emplear inóculos de bacterias lácticas especializadas para la pulpa de café, que permita una rápida formación de ácido láctico y evite la proliferación de microorganismos indeseables que den lugar a la formación de etanol y ácido acético. El destino de la pulpa ensilada adecuadamente podrá tener diversas aplicaciones. En este sentido existen alternativas que ya han sido ensayadas con éxito como el composteo, lombricultura y producción de setas comestibles, cuyos productos finales se destinan a la agricultura y al consumo humano.

La pulpa ensilada es un material rico en nutrientes que puede ser utilizado para la alimentación animal, sin embargo, su empleo presenta limitaciones debido a su alto contenido de cafeína y polifenoles, principalmente. En este respecto, proponemos realizar proceso de fermentación en medio sólido de la pulpa ensilada para disminuir considerablemente el contenido de cafeína y polifenoles de la pulpa. Esta etapa se realiza con el empleo de hongos filamentosos (Penicillium y Aspergillus) capaces de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno y los polifenoles como fuente de carbono, bajo condiciones controladas de fermentación. El producto final de esta fermentación se puede destinar a animales monogástricos, poligástricos y a la acuacultura.

La combinación óptima de utilización de los subproductos del café deberá realizarse mediante estudios de investigación de operaciones que consideran el desarrollo económico y tecnológico de los procesos.

INTRODUCCIÓN

A producción de café en el mundo es una actividad comercial importante que da como consecuencia una derrama económica localizada principalmente en países de América Latina, que en orden de producción son Brasil, Colombia y México. El proceso que se utiliza en México y Colombia es el llamado beneficio húmedo, que utiliza cantidades variables de agua, mientras que en Brasil el proceso que se emplea de manera mas extendida es el proceso seco. En el caso particular de México, la producción de café verde en 1998-1999 se estima cercana a 5 millones de sacos (60 kg) de café verde. El grano de café representa cerca del 50 % del café cereza en base seca. La proporción de pulpa en el café cereza puede cambiar de acuerdo al estado de madurez de la cereza, condiciones climáticas y la variedad de café cultivada. Sin embargo se puede aceptar que la pulpa y el mucilago representan cerca del 30 y 10 % del café cereza, respectivamente. Esto implica una cantidad muy importante de residuos a tratar es decir del orden de 1-0.8 millones de Toneladas, concentrados en dos estados. Veracruz (23%) y Chiapas (34%), y en un temporada de alrededor de 6 meses.

Por otra parte, la normatividad en respecto a las descargas en los beneficios están cambiando rápidamente, en el caso de México el 1 de Enero de 2000 entrará en vigor una norma que indica que la descarga de los beneficios deberá tener un nivel de DBO menor a 1500 ppm. Esto ha llevado a los beneficiadores a esforzarse por reducir notablemente el consumo de agua en casi un 90%. Con el uso de las despulpadoras actuales

se llega a consumir 300-800 L por ton de café cereza. Sin embargo, persiste el gasto de agua en el proceso de fermentación y lavado. Por otra parte, existe un esfuerzo importante de parte de las empresas constructoras de equipo de proporcionar desmucilaginadoras que operan con un consumo muy bajo de agua, generando un residuo concentrado que es el mucilago, en forma de un especie de miel densa y muy concentrada en sólidos solubles y suspendidos.

Así mismo la fluctuación de los precios del café cereza ha sido importante en los últimos diez años, con precios tan extremos que varían desde 52 a 254 US dólares por saco de 100 libras. Actualmente la cotización del saco de café verde en la bolsa de Nueva York oscila alrededor de 100 US dólares por saco. Esto puede sugerir la conveniencia de considerar los residuos de la cereza del café como una alternativa para equilibrar la economía fluctuante de la industria cafetalera (Claridades Agropecuarias, 1999).

Las alternativas que se han explorado para aprovechar los residuos son muy variadas e incluyen la lombricultura, producción de setas comestibles, alimentación de ganado, secado, etc. algunas de las cuales ya han sido presentadas ampliamente en este evento por otros conferencistas.

Estas alternativas van de complejas a muy sencillas, sin embargo algunas de estas alternativas no han sido evaluadas aun económicamente. La solución tecnológica no es única, depende del desarrollo tecnológico del beneficio, de la inversión a realizar y de su recuperación.

Una de las alternativas estudiadas es la utilización de la pulpa de café como alimento animal, que se ve limitada a causa de su elevado contenido de humedad, haciendo difícil su manejo, transporte y almacenamiento; esta humedad, junto con su contenido rico en nutrientes (azúcares, proteínas, aminoácidos) favorecen el desarrollo de su microflora endógena, que en condiciones incontroladas puede afectar la calidad del producto, además de que es difícil su conservación. Además, en la pulpa de café están presentes sustancias con efectos antifisiológicos como la cafeína, y antinutricionales como los compuestos fenólicos que constituyen el principal factor limitante para su utilización en alimentación animal. La información disponible sobre los compuestos fenólicos de la pulpa de café es escasa, más cualitativa que cuantitativa, y obtenida generalmente a partir del material fresco. En cerdos y ganado de carne, alimentados con pulpa de café, se ha observado un aumento en la excresión de orina; niveles mayores de 30% de la pulpa en la ración pueden causar mortalidad en ratas y pollos jóvenes. En el ganado se ha observado digestibilidad baja de la proteína, lesiones en la piel, pérdida de pelo y en algunos casos la muerte cuando hay consumos altos de pulpa.

Por otra parte, la Fermentación en Medio Sólido se define como el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de agua libre. Sin embargo, el sustrato puede contener suficiente humedad para favorecer el crecimiento microbiano y que existe en forma absorbida dentro de la matriz sólida (Pandey, 1992). El origen de las fermentaciones en medio sólido no es reciente, el hombre las ha utilizado desde hace mucho tiempo, ya sea para la preparación de alimentos fermentados o quesos, así como para el ensilaje (Moo-Young y col., 1983; Hesseltine, 1987).

La FMS se propone como una alternativa en las tecnologías actualmente empleadas para la utilización y la valorización de productos agrícolas primarios. El objetivo de numerosas fermentaciones sólidas alimentarias tradicionales no es aumentar la cantidad de proteínas *de novo* en los alimentos, pero sí mejorar las posibilidades de conservación, de transformar propiedades físicas u organolépticas. Por otra parte, estas fermentaciones permiten eliminar los factores antinutricionales o antifisilógicos de ciertos productos vegetales. En el caso de la pulpa de café, su valor nutritivo puede mejorarse a través de una fermentación sólida con hongos filamentosos empleando la cafeína como fuente de nitrógeno para su crecimiento, y posiblemente los taninos como fuente de carbono (Roussos y col., 1989).

El objetivo de este trabajo es presentar los avances mas recientes en relación a la degradación de la cafeína en la pulpa de café a través de un proceso de fermentación en medio sólido.

MATERIALES Y METODOS

Sustratos: Las muestras de pulpa fresca (PF) se obtuvieron un beneficio de café en la zona de Jalapa, Veracruz, México durante la cosecha de 1997-1998. Una parte de las muestras se congeló a -20 ^{0}C hasta su utilización. Un total de 220 kg de pulpa fueron ensilados con una cepa de bacteria homoláctica a una concentración de 2.63

- 5.26 x 10^7 cel/g MH, obteniendo as' la pulpa ensilada (PE).

Pasteurización: Las muestras de PF y PE, fueron pasteurizadas en corriente de vapor a presión atmosférica (95 ^oC) durante 1 h. Se analizaron cuentas de UFC y humedad. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 h.

Desarrollo de los inóculos: Se utilizó una cepa de *Penicillium comune* (V33A25), aislada de la PC perteneciente a la colección IRD (exORSTOM) y UAM y que ha mostrado capacidad de degradación de cafeína (Aquiahualt y col., 1988; Gaime-Perraud, 1995; Hakil y col., 1997; Roussos y col., 1995). La cepa se subcultivo a 30 ^oC durante 7 días. Los niveles de inóculo probados fue de 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 y 10^8 esporas g^{-1} de sólido húmedo.

Condiciones de fermentación: Las experiencias de FMS se realizaron en el sistema descrito por Raimbault y Alazard en 1980, a una densidad aparente de 0.6 g cm^{-3}, 30 ^oC y con un flujo de aire húmedo de 0.5 vkgm (dm^3 de aire * kg^{-1} de medio * min^{-1}).

Determinaciones analíticas: Las muestras sólidas fueron molidas con picador Braun por 20 seg y extraídas con agua en agitación, 20 min, 1:10 (p/p). El pH se midió en la suspensión resultante con un potenciómetro. Las suspensiones fueron decantadas en centrífuga Hettich a 5000x g por 20 min y los sobrenadantes se conservaron a -20 ^oC hasta su análisis. El contenido de humedad de las muestras sólidas se determinó por gravimetría.
La concentración de ácidos grasos volátiles (AGV'S), glucosa y fructosa se realizó por HPLC en un cromatógrafo Perkin Elmer con las condiciones siguientes: columna Rezek Organic Acid, fase móvil H_2SO_4 30 mM, flujo 0.6 cm^3 min^{-1}, temperatura 50 ^oC, detector de índice de refracción.
La cafeína se extrajo de las muestras sólidas secas y trituradas y tamizadas (malla 35) con una mezcla de cloroformo/ isopropanol (50:50 v/v). La cafeína en los extractos se determinó por , respectivamente. Con la disminución de humedad se evitan los riesgos de escurrimientos en la FMS.

HPLC, empleando una modificación a la técnica reportada por Denis en 1996.

Determinación de CO_2 por cromatografía de gases: Se empleó un cromatógrafo de gases Gow-Mac 580, equipado con una columna concéntrica Alltech (CTR1) y un detector de conductividad térmica de acuerdo a lo reportado por Saucedo-Castañeda y col., 1994.

Conteo de microorganismos: Se utilizó medio Agar para Métodos Estándar (Bioxón) para los conteos de microorganismos totales y PDA (Bioxón) con antibiótico para conteo de hongos y levaduras. Los conteos se realizaron a las 24 h de incubación a una temperatura de 30 ^oC. Los resultados se expresaron como UFC g^{-1} de materia seca (Perraud-Gaime, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSION

Pasteurización de la PF y PE

Como se aprecia en la Figura 1 la carga inicial de microorganismos totales y de hongos y levaduras es 2 veces superior en la PF que en la PE. Durante la pasterización de la PE y la PF se obtuvo una reducción completa de los microorganismos presentes a los 20 min de exposición a corriente de vapor directo para ambos sustratos. Esto permitió reducir la carga contaminante de la PC en un corto tiempo y estandarizar las condiciones iniciales para la FMS por esto se decidió hacer la pasteurización por 20 min a los sustratos utilizados en las experiencias posteriores.
Por otra parte la pasteurización no provocó un aumento apreciable en el contenido de agua de los sustratos tratados (Figura 2) sino que se mantuvo constante durante entre 78 y 83 % de humedad durante todo el proceso de pasteurización. No obstante los sustratos se mantienen con un alto contenido de agua al final del tratamiento térmico lo que puede provocar pérdidas de agua y nutrientes por escurrimiento durante la FMS. Para evitar este contratiempo se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 h y se logró reducir los niveles de humedad hasta 74.15 y 75.43 % en PE y PF

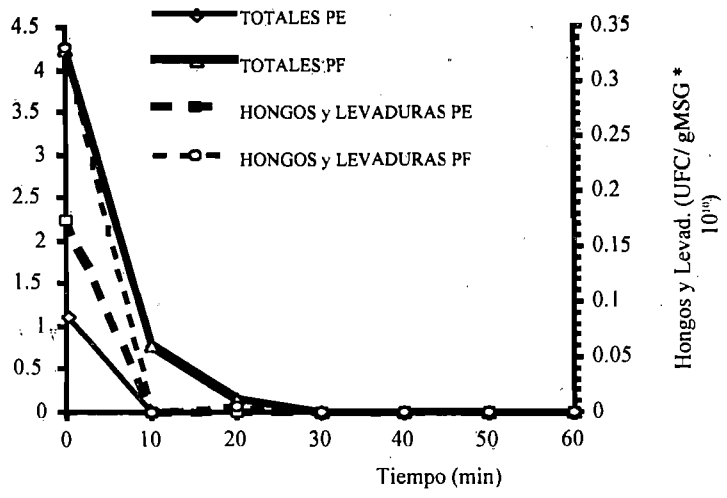


Figura 1. Reducción de la microflora presente en la pulpa de café ensilada (PE) y fresca (PF) con el tiempo de pasteurización con vapor directo a 95 °C.

Efecto de la pasteurización en la degradación de cafeína en PE

Para estudiar el efecto que tuvo la pasterización en la degradación de la cafeína en PE por la cepa de *P. comune* empleada se realizaron experiencias con PE pasteurizada y sin pasteurizar. Se probó el efecto de diferentes niveles de inóculo en la FMS en ambos materiales.

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en 4 días de FMS. Se observó un cambio significativo de 30 % (α=0.05) en la reducción de la cafeína presente cuando se pasteurizó la PE por 20 min en corriente de vapor, se secó a temperatura ambiente 24 h y se inoculó con *P. comune*. Estos resultados mostraron que para lograr niveles apreciables de reducción de cafeína (94 %) en cortos tiempos (4 días) fue necesario reducir la carga inicial de contaminantes para favorecer el crecimiento de la cepa de hongo empleada. Cuando no se pasteurizó se redujo la degradación hasta 60 - 70 %, comparable a la obtenida en las experiencias descritas en párrafos precedentes para el mismo tiempo de fermentación.

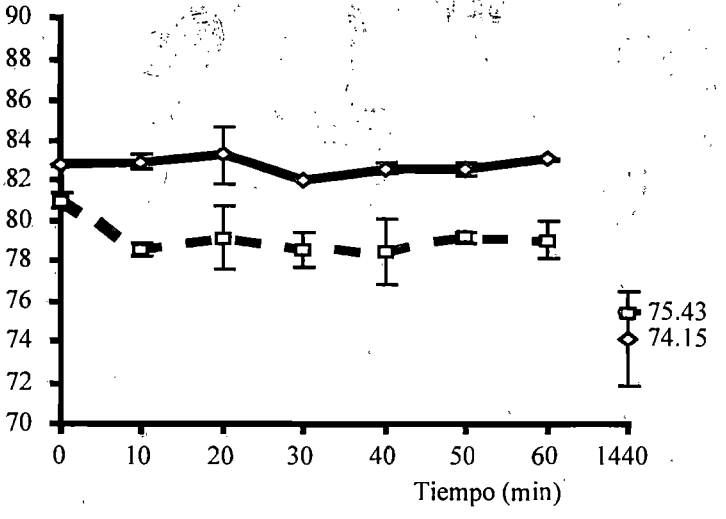


Figura 2. Comportamiento del contenido de humedad en pulpa de café ensilada (-◊-) y fresca (-o-) durante la pasteurización con corriente de vapor a 95 °C y secado posterior a temperatura ambiente por 24 h.

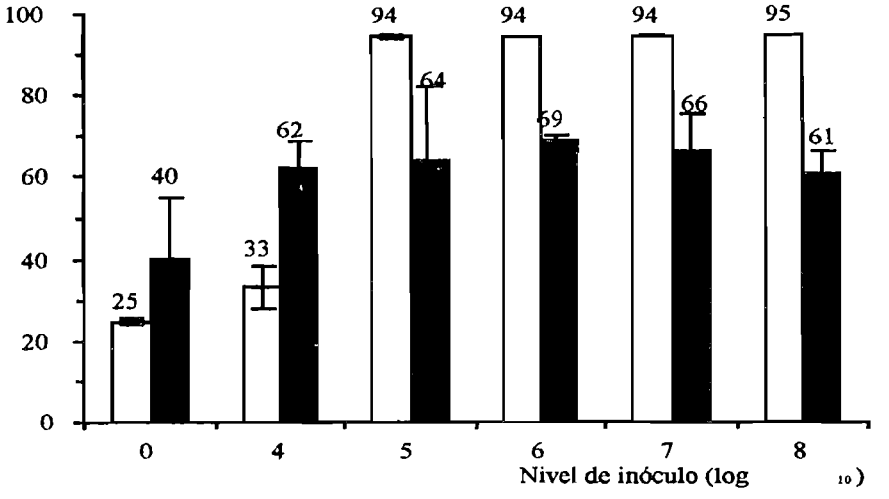


Figura 3. Eficiencia de degradación de cafeína por *P. comune* en 4 días de fermentación en medio sólido de pulpa de café ensilada pasteurizada (barras vacías) y sin pasteurizar (barras rellenas).
La inoculación de la PE aumentó la velocidad de producción de dióxido de carbono como se observa en la

El aumento de la concentración de inóculo tuvo un efecto positivo en la degradación de la cafeína a partir de una concentración de 10^5 esporas g^{-1} de sustrato húmedo. Un aumento del nivel de inóculo hasta 10^8 esporas g^{-1} no produjo un incremento apreciable en la degradación de cafeína. Cuando no se inoculó el sustrato la microflora natural degradó solo el 40 % de la cafeína presente en PE sin pasterizar. Lo anterior corroboró el planteamiento inicial propuesto sobre la necesidad de inocular la PE, con la cepa de *P. comune* que tiene la capacidad para degradar cafeína, para lograr altas eficiencias en la reducción del contenido de cafeína.

Es necesario aclarar que aunque no se alcanzaron las eficiencias de reducción de la cafeína obtenidas en otros trabajos se continua estudiando en proceso de FMS sobre los sustratos naturales PF y PE para incrementar los niveles de reducción.

Figura 4. Al inicio de la fermentaciones se observó un tiempo de retardo en la germinación de 12 a 20 h provocado por la presencia de ácidos orgánicos del ensilaje. Las velocidades máximas se obtuvieron primero en PE pasteurizada, 36 h, (Figura 4a) que en PE sin pasteurizar (48 h) (Figura 4b). Los valores de velocidades máximas superiores encontrados en PE sin pasteurizar se debieron a la contribución de la microflora natural de la PE a la producción de CO_2.

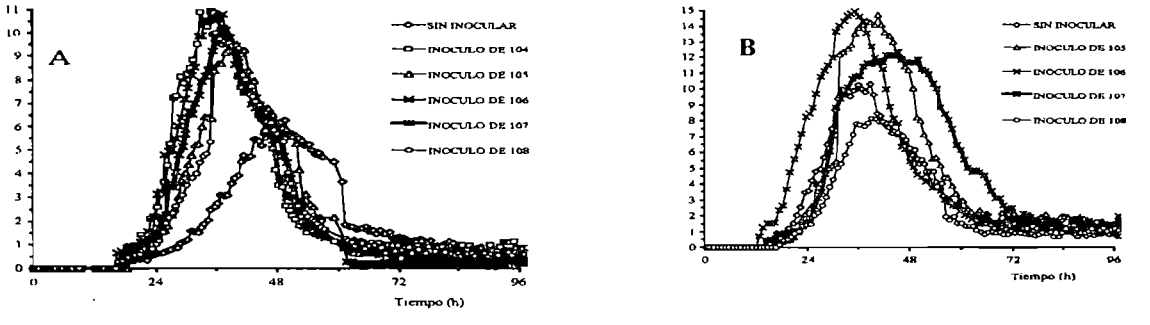


Figura 4. Comportamiento de la velocidad de producción de CO_2 en 4 días de fermentación en m edio sólido de pulpa de café ensilada pasteurizada (**a**) y sin pasteurizar (**b**) con diferentes niveles de inóculo de *P. comune*.

CONCLUSIONES

El ensilado de la PC favoreció la degradación de la cafeína de la pulpa de café por la cepa de *P. comune* utilizada. La pasteurización mejoró la eficiencia degradativa del hongo por la eliminación de contaminantes. La inoculación de la PE con niveles de 10^6 esporas g^{-1} de sustrato húmedo aumentó significativamente la eficiencia de degradación de la cafeína presente.

Los resultados obtenidos mostraron la viabilidad de utilizar la FMS para reducir el contenido de cafeína de la PC sin alterar las características del sustrato y con la posibilidad de poder utilizar primero el ensilado como un método sencillo de conservación para después degradar la cafeína de la PE bajo condiciones controladas de FMS. Además se establecieron estas condiciones lo que permitirá enfrentar el escalamiento del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por la Comunidad Europea contrato IC 18 * CT 970185

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aquiahualt M.A., Roussos S. y Trejo M.R. (1988). Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: Isolation identification and physiological sudies. Proceedings of the seminar Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials, M. Raimbault, ORSTOM (Eds.), Montpellier, France, 13-26.

Anónimo (1999). Coffee supply and demand balance. Edición especial de: *Claridades Agropecuarias*, México, H. Fanghanel y C. Montañez (Eds.). pp 21-36.

Denis S. (1996). Degradation de la cafeine par *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp.: Etude physiologique et biochimique. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 180 p.

Gaime-Perraud I. (1995). Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decafeination de la pulpe de cafe. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 210 p.

Hakil M., Denis S., Viniegra-González G. y Augur C. (1998). Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microb. Technol.*, 22: 355-359.

Hesseltine C W. (1987). Solid state fermentation - An overview. Int. Biodeterioration, 23: 79-89.

Moo-Young M. A., Moreira R. y Tengerdy R. P. (1983) Principles of solid substrate fermentation of the filamentous fungi. En: Fungal Biotechnology, S. E. Smith, D. R. Berry y B. Vristiunsen (Eds.), Arnold, Londres. Vol.IV: 117-174.

Pandey A. (1992). Recent process development in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 27: 109-117.

Raimbault M. y Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Europ. Jour. of Appl. Microbiol. and Biotechnol*, 9: 199-209.

Roussos S., Aquiahualt M. A., Cassaigne J., Favela e., Gutiérrez M., Hannibal L., Huerta S., Nava G., Raimbault M., Rodríguez W., Salas J. A., Sánchez R., Trejo-Hernández M. R. y Viniegra-González G. (199). Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. Resúmenes I-SIBAC, Jalapa, México, 12-15 Abril. Parte II: 121-143.

Roussos S., Aquiahualt M. A., Trejo-Hernández M. R., Gaime-Perraud I., Favela E., Ramakrishna M., Raimbault M. y Viniegra-González G. (1995). Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 756-762.

13 Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M. R., Lonsane B. K., Navarro J. M., Roussos S. y Raimbault M. (1994). On-line automated monitoring and control system for CO2 and O2 in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29: 13-24.

LOMBRICOMPOSTAJE DE LA PULPA DE CAFÉ EN MÉXICO

Eduardo Aranda-Delgado, Isabelle Barois

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SUELOS, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C., Apdo. Postal 63, Xalapa, Ver. México. E-Mail: isabelle@ecologia.edu.mx

INTRODUCCIÓN

México fué el primer país en proponer y utilizar desde 1985, la Ecotecnología del Lombricompostaje para la transformación de la pulpa de café en abono orgánico (Aranda, 1985, 1989, 1991[a], 1991[b]). En este sentido, la práctica del lombricompostaje podría definirse como la combinación de procesos biológicos, diseños y técnicas utilizadas para cultivar intensiva y sistemáticamente cierto tipo de lombrices *epígeas* , para acelerar la estabilización de los resíduos orgánicos. Los cuales son ingeridos, molidos y digeridos por las lombrices con la ayuda de microorganismos aeróbicos y de ésta manera se convierten en un abono granuloso, "Vermicompost o humus de lombrices"; un material humificado, activo microbiológicamente, con excelente porosidad, aereación y capacidad de retención de agua, rico en nutrientes disponibles, hormonas, enzimas y microorganismos útiles del suelo. Por éstas características, el producto es un medio valioso, superior y comercializable como acondicionador del suelo y sustrato del crecimiento para las plantas (Edwards and Bohlen, 1996, Aranda *et al.*, 1999; Edwards (en prensa)).

Con la ayuda de las lombrices, la pulpa de café (obtenida por el Beneficiado Húmedo) y muchos otros resíduos orgánicos, pueden ser transformados eficientemente en vermicompost de utilidad para los suelos, la producción agrícola y también para el medio urbano. Los nutrientes en el vermicompost se encuentran fácilmente disponibles para las plantas y pueden ser adicionados al suelo agrícola para mejorar su fertilidad y estructura o ser usado como aditivo de alta calidad comercial como sutrato para macetas y medio de crecimiento intensivo para las plantas.

EL PROBLEMA DE LA PULPA DEL CAFE

La disposición de los resíduos orgánicos es uno de los principales problemas en las unidades de procesamiento de café o "Beneficios Húmedos".

En el procesamiento húmedo tradicional, son generados aproximadamente tres toneladas de subproductos y son requeridas cuatro toneladas de agua para producir una tonelada de café oro seco (Rolz *et al.*, 1982). La Pulpa del café es el mayor de estos resíduos de la agroindustria del café y se produce cuando las dos semillas son extraidas del fruto fresco por las "despulpadoras". La pulpa representa alrededor del 39 % del peso fresco del fruto, o el 28.7 % en base seca (Zuluaga,1989) Esta pulpa fué durante mucho tiempo arrojada en grandes pilas en barrancos o cerca de los ríos causando contaminación del suelo y agua.

La producción anual para México se estima en 661,000 toneladas (Consejo Mexicano del Café, 1997) y de acuerdo con los datos proporcionados por Zuluaga (1989) del promedio de producción mundial (85 millones de sacos de 60 kg, 75 % café arábigo), aproximadamente 8.057 millones de toneladas es producida anualmente en el mundo.

Aunque se hicieron grandes esfuerzos para usar la pulpa del café fresca para la alimentación de animales (Braham and Bressani, 1978), los contenidos de polifenoles, taninos, acidos clorogénicos, ferúlicos y caféicos en la pulpa (Roussos *et al.*, 1989), obstruyen la viabilidad para alimentación animal.

En muestreos de macrofauna realizados en grandes acumulaciones de pulpa de café abandonada en campo en México, se encontraron poblaciones activas de macrofauna de grupos tales como Diptera, Acarida, Oligochaeta, Coleoptera, Thysanoptera y Collembola, entre otras. Las lombrices mas comunmente encontradas en tales acumulaciones de pulpa de caféfueron *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872) en el estado inicial, o *Amynthas gracilis* (Kinberg, 1867) y *Dichogaster sp.* en los estados mas avanzados, mientras que *Eisenia fetida* ó *E. andrei* fueron raramente encontradas (Aranda y Arellano, 1995).

Sin embargo, en todas las acumulaciones observadas, fué evidente que la proliferación de la macrofauna solo alcanzó las capas mas superficiales, alrededor de los 5 a 30 cm solamente, mientras que las capas mas internas, la pulpa se torna amarillenta (cuando es fresca es roja brillante) acida (3-4) y caliente (hasta 65 C). Sin oxígeno ni macrofauna activa presente

(Gaime-Perraud *et al.*, 1991a, 1991b, Gaime-Perraud, 1995); este material inactivo, rústicamente "ensilado"solo reinicia su descomposición orgánica, hasta que es físicamente removido y aereado. Con esta clara evidencia, puede ser concluido que la pulpa requiere de un eficiente y efectivo método de tratamiento para promover y completar su descomposición orgánica y favorecer su aprovechamiento. La estabilización de la pulpa del café con *lombrices composteadoras* puede contribuir a resolver un importante problema de contaminación ambiental, modificando estos aspectos negativos en materiales útiles y productivos.

EL PROCESO DE VERMICOMPOSTAJE

A diferencia de otros métodos de compostaje, el Vermi-compostaje toma ventaja de las cualidades biológicas y fisiológicas de las lombrices composteadoras, para estimular la descomposición microbiana aeróbica de los resíduos orgánicos; de hecho la asimilación de las lombrices se deriva de los microorganismos que ellas estimulan en la materia orgánica. Las siguientes son algunas de las propiedades que han sido reconocidas (Van Gansen, 1962; Satchell, 1983; Tomati *et al.*, 1987; Edwards and Neuhauser, 1988; Edwards and Bohlen, 1996; Aranda *et al.*, 1999) y que se resumen en Aranda y Bares (en prensa): 1.- Las lombrices fabrican galerías en la materia orgánica, lo que favorece su aereación y ventilación, 2.-Recubren las paredes de las galerías con un muco gelatinoso que favorece el desarrollo de microorganismos, 3.- Con su aparato digestivo las lombrices trituran y muelen la materia orgánica, 4.- Reducen o eliminan microorganismos patógenos de plantas y animales, 5.- Durante su paso por el tracto digestivo, mezclan los diferentes componentes de la materia orgánica, 6.- Cada turrículo o excreta, se recubre de una membrana gelatinosa, mucoprotéica, la "membrana peritrófica", que da cohesión y soporte a la materia orgánica procesada, 7.- Al colocar sus excretas superficialmente, cubren la materia orgánica más fresca, lo que abate la generación de olores y la atracción de insectos, 8.- Durante el proceso se generan importantes compuestos orgánicos reguladores como enzimas, antibióticos, vitaminas, hormonas y sustancias húmicas, 9.- Los turrículos (heces o casts) conservan en el suelo su estructura y porosidad, lo que asegura una liberación lenta y regulada de los nutrientes, evitando pérdidas por erosión, lavado o lixiviado, 10.- Por añadidura, en cada ciclo se producen más lombrices, lo que permite aumentar la capacidad o aprovecharlas como proteínas de alto valor biológico.

VERMICOMPOSTAJE DE LA PULPA DEL CAFÉ

La comunidad científica internacional y los programas de investigación han dado a la Vermicultura un análisis serio crítico y científico, estableciendo el potencial efectivo que la Vermicultura representa (Bouché,1987; Satchell, 1983; Bonvicini-Pagliai y Omodeo,1987; Edwards y Neuhauser, 1988; Kretzchmar, 1992; Hoerschelmann y Andrés, 1994; Edwards, 1997).

Para desarrollar un exitoso cultivo de lombrices con pulpa de café y producir un eficiente bioabono para las plantas, son requeridos varios componentes: 1) especies adecuadas de lombrices, 2) Una apropiada calidad y conservación del sustrato, c)correctas condiciones ambientales externas e internas al cultivo y d) un eficiente diseño y operación del cultivo.

Especies de Lombrices

Las especies mas comunes de lombrices usadas en todo el mundo para el manejo de los resíduos orgánicos incluyen a *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) ó lombriz roja y su especie cercana *E. fetida* (Savigny, 1826) lombriz tigre o bandeada, ambas alguna vez confundidas como *E. foetida* hasta su aclaración completa (Jaenike, 1982). Ambas son lombrices resistentes, con amplios márgenes de tolerancia a la temperatura, PH y humedad. En cultivos mixtos (con otras especies) *Eisenia andrei* usualmente se llega a hacer dominante (Edwards y Bohlen, 1996; Salazar *et al.*, 1995).

Muchos sitios de Vermicompostaje en México (con *E. andrei*) tienen también poblaciones involuntarias de *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872), la Lombriz Oriental de las compostas, que se iniciaron a partir de poblaciones silvestres. Esta especie de distribución tropical puede ser utilizada satisfactoriamente en campo y en algunas circunstancias puede incluso llegar a superar a las poblaciones inoculadas de *E. andrei*. Es una especie común en Asia y es usada extensivamente en Filipinas y Australia (Edwards y Bohlen, 1996; Guerrero, 1983).

Propiedades Biológicas y Demograficas de las Lombrices

Las lombrices tienen un ciclo de vida muy simple, siempre en el interior de la materia orgánica. Una de las razones por la cual las lombrices se multiplican tan rápidamente es por ser hermafroditas, por lo cual todos los individuos poseen genitales masculinos y femeninos; aún así se requiere la copulación entre dos individuos. Todos los individuos producen cocoones o capullos, dentro de los cuales pueden desarrollarse de 1-5 individuos, dependiendo de la especie, del crecimiento de los padres y del tamaño de los capullos.

Aunque en condiciones controladas (Arellano, 1997) pueden ser obtenidas densidades de 50,000 individuos por m^2 (con 3,540 g m^{-2}) de *E. andrei* en pulpa de café, para aspectos prácticos en condiciones de campo, es posible asumir buenos valores de densidad poblacional en alrededor de 20- 25 mil individuos por m^2. El equivalente de esta cantidad de lombrices es una biomasa equivalente alrededor de 2,500-3,000 g m^{-2}, es decir un promedio (considerando adultos y juveniles juntos) de aprox. 0.110 g por lombriz. Mientras mas bajo es el valor de densidad poblacional, mas alto es el valor del peso promedio individual de las lombrices; al contrario, una población mas altamente concentrada, su crecimiento individual, su tasa de reproducción y algunos otros aspectos disminuyen en relación a los ejemplares individuales. Si consideramos (solo hasta cierto punto) que más biomasa puede ser alcanzada con más individuos, (aunque cada uno de ellos esté menos desarrollados), entonces la *Capacidad de Carga* puede ser entendida como el valor *óptimo* de densidad poblacional en la cual se obtiene una *máxima* producción de biomasa en una determinada area o volúmen (estimada en 532.4 g m^{-2} en *P. excavatus*, y 3,371.1 g m^{-2} en *E. andrei,* contra un valor de 926 g m^{-2} de *E. andrei* en estiercol de caballo (Arellano, 1997). Esta relación de *densidad-dependencia* también implica que la mejor manera de prevenir condiciones estancadas de sobrepoblación, es extrayendo sistemáticamente lombrices de las camas de vermicompostaje para extender el cultivo o como fuente de proteínas para la alimentación de animales (Taboga, 1980; Hartenstein,1981; Tacon *et al.*, 1983; Velásquez *et al.*,1986; Guerra, 1982).

La Pulpa de Café como Sustrato

La pulpa del café tiene una alta capacidad de retención de agua (cercana a 4 veces su propio peso seco), una buena densidad aparente (alrededor de 0.500 kg l^{-1} cuando fresca y 0.700 kg l^{-1} cuando es aplicada a las lombrices), un potencial de oxido-reducción alrededor de 450 mv, pH practicamente neutro (7.4) y un tamaño uniforme y manejable. En relación a su contenido de nutrientes, la pulpa de café no requiere aditivos ni extracciones o modificaciones previas para poder ser utilizada para la alimentación de lombrices, es un sustrato "limpio", libre de contaminantes. Comparada con otros resíduos orgánicos, la pulpa de café puede ser considerada como uno de los mejores residuos orgánicos (originados de plantas) para cultivar lombrices.

Factores Ambientales

Condiciones óptimas generales para cultivar lombrices han sido presentadas para *E. fetida-E.andrei* por Lofs-Holmin (1985), Edwards and Neuhauser (1988), quienes sugieren que estas condiciones no difieren mucho de aquellas presentes para otras especies similares: temperatura, 15-20 C (limites 4-30 C); humedad, 80-90% (limites 60-90%); aerobicidad, >15 % O_2 ; contenido de CO_2 <6%; potencial Redox, Eh >-100mV; contenido de amonia bajo,<0.5%; contenido de sales bajo, <0.5%; y un pH >5 y <9.

Uno de los factores limitantes al proveer resíduos orgánicos a las lombrices, es la temperatura que se puede generar por los microorganismos si se colocan capas gruesas en las camas de vermicompostaje, pues temperaturas >30-35 C pueden hacerlas escapar del medio o incluso matarlas. Para evitar tales sobrecalentamientos, es necesario adicionar capas relativamente delgadas (aprox. 10 cm) y permitir que las lombrices las procesen en condiciones aeróbicas. Cuando el sustrato está cerca de ser totalmente consumido, otra nueva capa de sustrato debe ser adicionada, evitando dejar a las lombrices sin alimento. Alimentaciones quincenales son el periodo mas practicado, sin embargo siempre verificando por observación directa la necesidad de alimentación.

Conversión Pulpa-Vermicompost

Si comparámos el contenido de nutrientes de la pulpa fresca con el producto resultante del vermicompostaje, podemos reconocer que éste último contiene por lo general aproximadamente el doble de los porcentajes de cada elemento químico (excepto para el carbono) (**Tabla 1**). Esto puede ser explicado en términos de la

reducción del material, restando sòlo cerca del 30% del peso fresco inicial. En base seca, el vermicompost representa aprox. el 40% del total de sólidos de la pulpa de café inicial (Irissón, 1995).

Tabla 1. Caracterización química del vermicompost obtenido de la pulpa del café (Irissón, 1995)

			TRATAMIENTOS				
ANALISIS	CP	E.a.	E.f.	P.e.	3 spp	Comp.	Ctrl
CONTENIDO DE AGUA (%)	87.30 (a)	64.66 (e)	65.61 (d)	68.92 (b)	60.64 (g)	63.09 (f)	66.99 (c)
TOTAL DE SOLIDOS (%)	13.70 (f)	35.34 (d)	34.39 (d)	31.08 (e)	39.36 (a)	36.91 (b)	34.68 (d)
PH	7.08 (a)	6.51(c)	6.51 (c)	6.72 (b)	6.29 (d)	6.02 (e)	6.09 (e)
NITROGENO TOTAL (%)	2.00 (e)	4.00 (c)	4.23 (a)	4.07 (b)	4.00 (c)	3.30 (d)	3.99 (c)
N-NO3 (ppm)	-	1,137.82 (b)	53.60 (c)	1,775.01 (a)	1,130.26 (b)	1,806.57 (a)	18.45 (c)
N-NH4 (ppm)	-	829.45 (b)	538.54 (e)	846.58 (a)	846.00 (a)	652.85 (d)	748.89 (c)
NITROGENO MINERAL (%)	-	0.20 (b)	0.06 (d)	0.26 (a)	0.20 (b)	0.25 (a)	0.08 (c)
NITROGENO ORGANICO (%)	-	3.80 (c)	4.17 (a)	3.80 (c)	3.80 (c)	3.05 (d)	3.91 (b)
FOSFORO TOTAL (%)	0.11 (g)	0.25 (b)	0.24 (c)	0.23 (d)	0.22 (d)	0.26 (a)	0.20 (f)
FOSFORO INORGANICO (%)	-	0.14(bc)	0.13 (d)	0.14(bc)	0.15 (b)	0.14(bc)	0.19 (a)
FOSFORO ORGANICO (%)	-	0.11 (a)	0.11 (a)	0.09 (b)	0.07 (b)	0.11 (a)	0.015 (c)
CALCIO (%)	0.75 (e)	1.72 (a)	1.73 (a)	1.65 (b)	1.50 (d)	1.60 (c)	1.40 (d)
MAGNESIO (%)	0.36 (g)	0.80 (b)	0.82 (a)	0.78 (c)	0.69 (f)	0.75 (d)	0.73 (d)
SODIO (%)	0.03 (c)	0.07 (a)	0.07 (a)	0.07 (a)	0.07 (a)	0.07 (a)	0.06 (b)
POTASIO (%)	0.35 (e)	0.73 (b)	0.78 (a)	0.73 (b)	0.70 (c)	0.53 (d)	0.52 (d)
COBRE (ppm)	1.00 (b)	19.68 (a)	19.01 (a)	19.92 (a)	19.79 (a)	19.67 (a)	19.93 (a)
FIERRO (ppm)	589.91 (f)	5,310.23 (b)	2,203.80 (e)	4,562.70 (c)	4,536.63 (c)	9,250.73 (a)	3,406.43 (d)
MANGANESO (ppm)	257.73 (g)	722.39 (d)	643.32 (e)	745.52 (c)	748.70 (b)	982.81 (a)	571.47 (f)
ZINC (ppm)	147.89 (g)	662.55 (e)	1,287.76 (a)	1,103.63 (b)	596.31 (d)	886.46 (c)	374.12 (f)
CENIZAS (%)	4.00 (f)	15.49 (c)	12.70 (e)	17.29 (b)	14.04 (d)	28.21 (a)	16.08 (c)
MATERIA ORGANICA (%)	96.00 (a)	84.51 (d)	87.30 (b)	82.71 (e)	85.96 (c)	71.79 (f)	83.92 (d)
CARBON (%)	55.68 (a)	48.84 (c)	50.29 (b)	48.36 (c)	49.86 (b)	41.64 (d)	48.68 (c)
RELACIÓN C/N	27.66 (a)	12.22 (c)	11.88 (d)	11.89 (d)	12.47(bc)	12.62 (b)	12.20 (c)
CAFEINA (%)	0.022 (a)	0.004 (f)	0.007 (d)	0.006 (e)	0.008 (c)	0.008 (c)	0.012 (b)
TANINOS (%)	0.16 (a)	0.010 (b)	0.010 (b)	0.009 (c)	0.012 (b)	0.007 (c)	0.014 (b)
PLOMO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CADMIO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ESTRONCIO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		COMPUESTOS ORGANICOS					
HUMINA (%)	-	74.30 (b)	84.22 (a)	70.34 (c)	73.89 (b)	83.95 (a)	67.50 (d)
ACIDOS HUMICOS(%)	-	15.11 (b)	11.00 (d)	22.08 (a)	13.76 (c)	10.45 (d)	22.68 (a)
ACIDOS FULVICOS(%)	-	10.60 (b)	4.78 (d)	7.58 (c)	12.35 (a)	5.60 (d)	9.82 (b)
HUMICOS / FULVICOS	-	1.43(d)	2.32 (b)	2.93 (a)	1.11 (d)	1.88 (c)	2.32 (b)
		ACTIVIDAD ENZIMATICA					
FOSFATASA ACIDA UI/g	-	9.59 (a)	9.14 (b)	8.42 (d)	6.99 (f)	8.49 (c)	7.83 (e)
FOSFATASA ALCALINA UI/g	-	6.74 (b)	8.08 (a)	5.71 (c)	4.68 (d)	3.88 (e)	2.14 (f)
UREASA UI/g		0.92 (c)	1.29 (a)	1.08 (b)	0.66 (d)	0.17 (f)	0.60 (e)
CP Pulpa de Cafe	**E.a.**	*E. andrei*	**E.f.**	*E. fetida*	**P.e.**	*P. excavatus*	
inicial	**3 spp**	3 spp juntas	**Comp**	Composteo	**Ctrl**	Pulpa sin tratamiento	
ND: No detectado						(control)	

Nota: Valores en cada hilera seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes. (p> 0.005) usando Anova de dos vías.

El humus de lombrices es producto estabilizado, con un pH neutro, se encuentra naturalmente libre de semillas, patógenos, pesticidas y metales pesados. Está formado por las excretas o turrículos, producto de la digestión de las lombrices. Se presenta en la forma de infinidad de agregados cilindricos, de uno o dos milimetros de longitud, tiene un olor agradable a tierra fresca, de una coloración café obscura, casi negra y con una uniformidad, ligereza y porosidad que le confieren carácterísticas químicas, físicas y presentación excepcionales. Suministra a las plantas nutrimentos naturales y biologicamente asimilables, nitrógeno mineral y de liberación lenta, fósforo, potasio, calcio, magnesio, micronutrientes, además de una serie de compuestos orgánicos reguladores de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como son las hormonas, enzimas, antibióticos, vitaminas y acidos húmicos.

Diseño y Operación

El modelo básico para cultivar lombrices consiste en camellones de sustrato directamente sobre la tierra, de aprox. 1-2.5 m de ancho y longitudes adaptables a la configuración del terreno, bajo sombra artificial, o natural como enredaderas inducidas de "chayote" o de arboles como Macadamia o Ricino (*Ricinus sp.*). En algunos casos, algunos productores cubren directamente las camas de vermicompostaje utilizando puntas de caña, paja o costales viejos de yute, desechados por los propios beneficios de café; con el tiempo, éstos materiales terminan incorporandose al humus producido.

Como se mencionó anteriormente, el método tradicional de operación consiste en la adición sucesiva de capas delgadas de pulpa de café en la superficie de las camas; cerca de tres meses después, cuando la cama ha alcanzado una altura apreciable, se retira temporalmente la capa superior (en donde la mayoría de las lombrices se encuentran al seguir el alimento), para permitir la cosecha de las capas inferiores de vermicompost. La capa superior de sustrato con las lombrices puede ser colocada en el mismo sitio inicial o bien en una hilera vacía vecina, para reiniciar nuevamente la serie de alimentaciones de pulpa de café.

Solamente las grandes granjas de vermicompostaje utilizan maquinaria para su operación, mientras que la gran mayoría utiliza solamente equipo tipo jardinería, como carretillas, palas, bieldos, mangueras, etc. La mano de obra requerida equivale a un aproximado de una persona por cada 500 m^2 de camas de vermicompostaje.

Para el caso de la pulpa del café, se ha logrado establecer un sistema de producción que implica una estrecha y eficiente interrelación entre los ciclos de generación de pulpa, su transformación por las lombrices y su aprovechamientooportuno en las fincas cafetaleras (Aranda *et al*, 1999). Este sistema considera el establecimiento de camas con sustrato colocado por camiones de volteo en un solo evento, formando hileras alternas (una sí otra no), mismas que a lo largo de un ciclo productivo se transforman por las lombrices. La pulpa del siguiente ciclo se coloca en los surcos intercalados y durante el inicio de la epoca de lluvias, las lombrices se mudan por sí mismas desde las camas con humus ya procesado, hacia las camas con pulpa fresca. Las camas con el humus (ya sin lombrices) se retiran entonces y se aprovechan principalmente en los programas de viveros y de replantación de cafetales de la misma finca.

Producción de Vermicompost

Cuando el humus es destinado como producto comercial, debe entonces ser tamizado, embolsado y con rangos apropiados de humedad. Al cosecharse, el humus normalmente presenta un contenido excesivo de agua, (cercano a 80%) que dificulta su manejo y aprovechamiento, por lo que debe secarse utilizando los patios asoleaderos de los beneficios. Debido a la propiedad "anfifílica" del humus (Bouché, com. pers.), que siendo normalmente hidrofílico, pero que con secados excesivos se convierte en hidrofóbico, el humus presenta sus mejores características para uso y almacenamiento en valores cercanos al 50-60%; durante este secado, una tonelada de humus con 80% de húmedad, se llega a convertir en tan solo 500 kg de humus germinado (con 60% de humedad).

El tamizado se realiza, ya bien con la ayuda de tamizadoras manuales o utilizando sarandas mecánicas movidas con motor, para retirar piedras, ramas, basuras, partículas de pulpa reseca y grumos aglomerados; éstos últimos pueden utilizarse así para fertilizar las propias fincas o molerse mecanicamente para reincorporarse nuevamente a la producción comercial. La presentación comercial mas común del humus de lombrices es en forma pura en costales de rafia, en bolsas plásticas impresas, o en mezclas preparadas como sustrato de crecimiento para macetas y charolas de invernaderos. El transporte es siempre uno d e los factores limitantes de la comercialización del producto a distancia, pero se hacen esfuerzos para expander su mercado y ampliar su aceptación.

UTILIZACIÓN DEL VERMICOMPOST DE PULPA DE CAFÉ

El humus de lombrices de pulpa de café ha mostrado un ámplio rango de utilización en prácticamente cualquier suelo y proporción, siempre con resultados favorables y beneficiosos para las plantas y la fertilidad de los suelos. Sin embargo, los costos de elaboración y precios de venta lo han restringido a cultivos de buena rentabilidad, como hortalizas de exportación (chile, jitomate, brócoli, zanahoria, esparrago, etc.), en semilleros y viveros de invernadero o en plantaciones perennes como cafetos, papaya y flores de exportación, entre otros (García, 1978; Irissón, 1995; Rodríguez *et al*, 1995; Aranda y

Barois, en prensa). Los beneficios se manifiestan en mas rápidas emergencias y mayor prendimiento de semillas, mejor y más rápido crecimiento aereo y radicular y un desarrollo mas sano y vigoroso general de las plantas. Por otra parte, los suelos en donde se aplica mejoran su estructura, fertilidad y un aprovechamiento más eficiente de la fertilización mineral.

SITIOS DE VERMICOMPOSTAJE EN MÉXICO

En la actualidad, existen cerca de un centenar de sitios de vermicompostaje en México, que procesan de manera comercial o para autoconsumo pulpa de café, estiercol vacuno, cachaza de caña de azucar, otros estiercoles animales o resíduos orgánicos de mercados y de orígen urbano. En Términos generales, se estima que se producen anualmente en México entre 5,000 y 7,000 toneladas anuales de humus de lombrices que se utilizan para campos agrícolas, hortalizas, semilleros-viveros y jardínería en general. Existen solo unos cuantos sitios de tamaño grande (mayores a 5,000 m^2 de area efectiva), una veintena de sitios de tamaño mediano (de 200 a 1,000 m^2) y el resto se trata de sitios pequeños que procesan pequeñas cantidades de sustratos orgánicos, generalmente para autoconsumo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La Lombricultura en los últimos años está alcanzando rápidamente popularidad en México y se está aplicando crecientemente sobre nuevos sustratos orgánicos antes no aprovechados. Creemos que las estrategias actuales deben promover no solo su establecimiento inicial sino su consolidación técnica y económica. El establecimiento y ejecución de proyectos comerciales eficientes y bien fundamentados, debe contrarrestar la proliferación excesiva sobre bases poco sustentadas que lleve -como ha sucedido en otros países-, a la consiguiente desilusión de los cultivadores, a la sobreestimación del producto o incluso al descrédito y pérdida de los mercados de consumo ya conquistados.

Si el humus de lombrices está para ganar la reputación que merecidamente le corresponde, la creación de una Asociación Nacional de Lombricultores, constituye una tarea prioritaria para promover la aplicación eficiente y productiva de la tecnología, el establecimiento de criterios, normas y estándares de calidad de sus productos, el apoyo científico y sobre todo un oido atento y cercano para escuchar los comentarios y opinión de los usuarios de sus productos.

CONCLUSIONES

La pulpa de café no es ya considerada un resíduo orgánico indeseable y contaminante, sino una materia prima de la cual obtener un producto útil, sano y económica y ecológicamente beneficioso. El Humus de lombrices obtenido con la pulpa de café, presenta propiedades excepcionales de estructura, retención de humedad, nutrimentos, uniformidad y consistencia en sus resultados, en comparación con otros sustratos orgánicos utilizados.

Los resultados de las investigaciones y promoción realizadas, junto con la demanda de desarrollo de similares aplicaciones hacia otros resíduos orgánicos, agroindustriales, pecuarios y del medio urbano, indican que la potencialidad de esta tecnología está empezando a lograr reconocimiento. Nuevas alternativas económicas, mejores opciones de reciclamiento y aprovechamiento productivo de los resíduos orgánicos y una mejoría sustancial en la conservación del ambiente y la fertilidad de los suelos, es el objetivo y esencia de la vermicultura moderna, por lo cual su estudio, desarrollo y consolidación merece toda nuestro reconocimiento y atención.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Sevastianos Roussos del IRD-Francia y al Dr. Henri Poupon del IRD-México por su apoyo y financiamiento para la asistencia y participación del primer autor al III SIBAC; al Dr. Tumoru Sera y al Dr. Carlos Roberto Soccol, por su amistad y apoyo para la publicación de este artículo.

LITERATURA CITADA

Aranda, D.E. 1985. Las Lombrices transforman la pulpa de café en abono orgánico. Reporte Interno. Departamento de Entomología, Instituto Mexicano del Café, Xalapa, Ver. México. 8 p.

Aranda, D.E. 1989. Perspectivas de la utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. *Boletin Técnico de Café, I.M.C.*, México. 8 p.

Aranda, D.E. 1991[a]. El Vermicompostaje; una nueva alternativa para la transformación de la pulpa de café en Abono Orgánico. *en*: IICA-Promecafé, *Resumenes del XIV Simposio de Cafeticultura Latinoamericana,* Panamá, C.A. 120 p

Aranda, D.E. 1991[b]. El Vermicompostaje, la alternativa ecológica para transformar la pulpa de café en abono orgánico. *en: Resumenes del II Seminario Internacional de Biotecnológía en la Agroindustria Cafetalera*, Orstom-Cenicafe, Manizales, Colombia.

Aranda, D.E. y P.Arellano, 1995. Factores ambientales que influyen en la transformación de la pulpa de café abandonada en al campo. *en*: Barois, I. and E.Aranda *(eds.)*. Utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. Conacyt-Instituto de Ecología. Reporte Final. pp. 1-15.

Aranda, D.E. y S.Aguilar. 1995. Tasa de extracción de lombrices de *Eisenia andrei* para su utilización como proteína animal. *en*: Barois, I. y E. Aranda *(eds.)*. Utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. Conacyt-Instituto de Ecología. Reporte Final. pp.47-54.

Aranda, D.E., I.Barois, P.Arellano, S.Irissón, T.Salazar, J.Rodríguez, y J.C.Patrón, 1999. Vermicomposting in the Tropics. *en:* Lavelle, P., L.Brussaard, y P.Hendrix (*eds.*) 1999. Earthworm Management in Tropical Agroecosystems. CABI Publishing, U.K. pp. 253-287.

Aranda, D.E. y I.Barois, (en prensa). Vermicomposting in México. *en:* Edwards, C.A. (*ed.*) *Manual on Vermicomposting*. J&G Press, (Biocycle publisher). Emmaus, PA.

Arellano, P. 1997. Descomposición de la pulpa de café por *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) *y Perionyx excavatus* (Perrier, 1872) *(Annelida, Oligochaeta)*. Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México 84 p.

Barois, I. y E.Aranda *(eds.)*. 1995. Utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. Conacyt-Instituto de Ecología. (clave: 045-N9108) Reporte Final. 104p.

Bonvicini Pagliai A. M. y P.Omodeo (*eds.*), 1987. *On earthworms*. Selected Symposia and Monographs U.Z.I.. Ed. Mucchi, Modena. 562 p.

Bouché, M. 1987. Emergence and development of vermiculture and vermicomposting: from a hobby to an industry, from marketing to a biotechnology, from irrational to credible practises. *en:* Bonvicini Pagliai A. M. y P. Omodeo (*eds*). *On Earthworms*. Selected Symposia and Monographs U.Z.I.. Ed. Mucchi, Modena. pp. 519-532.

Braham, I.E. y R.Bressani, 1978. *La Pulpa de Café.* Centro Interamericano para el Desarrollo. Colombia.Consejo Mexicano del Café, 1997. *Estadisticas Cafetaleras*, D.F., México. 10 p.

Edwards,C.A. y E.Neuhauser, 1988.*Earthworms in waste and environmental management.* Academic Publishing, Netherlands. 392 p.

Edwards C. A., 1995. Historical overview of vermicomposting. *Biocycle* pp.56-58.

Edwards, C. A. y P.Bohlen. 1996. *The Biology and Ecology of Earthworms*. 3rd Edition Chapman and Hall, London. 426 p .

Edwards, C.A., 1997. Fifth International Symposium on Earthworm Ecology (ISEE 5). *Soil Biology and Biochemistry* 29(3/4): 215-766.

Edwards, C.A. (en prensa). *Manual on Vermicomposting*. J&G press, (Biocycle Publisher) Emmaus, PA.

Gaime-Perraud, I., L.Hannibal, M.Trejo y S.Roussos. 1991a. Resultados preliminares sobre el ensilaje de la pulpa de café. Resumen. *II Seminario Internacional de Biotecnología en la Agroindustría Cafetalera (II SIBAC)*, ORSTOM-CENICAFE, Manizales, Colombia.

Gaime-Perraud, I., J.Zuluaga, G.Saucedo, S.Roussos. 1991b. Microflora natural de café. *en:* Roussos, S. *(ed.)*. *Resumenes del II*

Seminario Internacional de Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera (II SIBAC), ORSTOM-CENICAFE, Manizales, Colombia.

Gaime-Perraud, I. 1995. Cultures mixtes en milieu solida de bacteries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decafeination de la pulpe de café. These de Doctorat Université Montpellier II, Sciences et Techniques de Languedoc. 209 p.

García, M.A.B. 1996. Algunos sustratos orgánicos, sus mezclas, caracterización y procedimientos. (Tesis profesional) Ingeniero Agrónomo en Suelos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, México. 144 p.

Guerra, P.L. 1982. Estudio preliminar sobre la utilización de la lombriz de tierra (*Helodrilus foetidus*) en la alimentación del bagre de canal (*Ictolus punctatus*). (Tesis profesional). Universidad Autonoma Agraria, Monterrey, Nuevo León, México.

Guerrero, R.D. 1983. The culture and use of *Perionyx excavatus* as a protein source in the Philippines. *en:* Satchell, J. (*ed.*). *Earthworm Ecology, from Darwin to Ecology*. Chapman and Hall. pp. 309-313.

Hartenstein, R. 1981. Production of earthworm *Eisenia foetida* as a potentialy economical source of protein. *Biotechnoly and Bioingenering.* 23, 1812-1997.

Hoerschelman, H. y H.G.Andres, 1994. Wilhelm Michaelsen Gedächtnis Symposion. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*. Hamburg. 200 p.

Irissón, N.S. 1995. Calidad del abono y de la lombriz de tierra resultante del lombricompostaje de la pulpa de café, (Tesis profesional). Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.85 p.

Jaenike, J. 1982. "*Eisenia foetida*" is two biological species. *Megadrilogica* 4(1,2): 6-7

Kretzschmar A. (*ed.*), 1992. Fourth International Symposium on Earthworm Ecology (ISEE 4). *Soil Biology and Biochemistry* 24(12): 1193-1774.

Lofs-Holmin A. 1985. *Vermiculture, present knowledge of the art of earthworm farming.* Inst. Ekol. Miljovard, Swedish University Agronomic Sciences 67 p.

Neuhauser, E.F., R.Hartenstein, y D.I.Kaplan, 1980. Growth of earthworm *Eisenia fetida* in relation to population density and food rationing. OIKOS, 35(1):93-98

Rodríguez, J., E.Aranda, I.Barois y E.Barrientos. 1995. Respuesta de cafetos (*Coffea arabica L*) en semillero-vivero a la aplicación de abono orgánico de pulpa de café y fertilizante químico. *en*: Barois, I. y E.Aranda *(eds.). Utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico.* Conacyt-Instituto de Ecología. Reporte Final. pp.65-73

Rolz, C., J.Menchú, F.Calzada, F.de León, R.García, 1982. Biotechnology in Washed Coffee Processing. *Process Biochemistry*, March/April 1982. pp. 9-11

Roussos, S., A.Aquiahuatl, J.Cassaigne, E.Favela, M.Gutierrez, L.Hannibal, S.Huerta, G.Nava, M.Raimbault, W.Rodríguez, J-A.Sanchez, M.Trejo, G.Viniegra-Gonzalez. 1989. Detoxificación de la Pulpa de Café por Fermentación Sólida. *en:* Roussos, S., R.Licona, M.Gutierrez *(eds.) Ier Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera.* ORSTOM-IMC-UAM. 210 p.

Salazar, T., E.Aranda y I.Barois. 1995. Estudio comparativo del lombricompostaje de la pulpa de café por *Eisenia andrei, Eisenia fetida* y *Perionyx excavatus* en condiciones de campo. *en:* Barois, I. y E.Aranda (eds). *Utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico.* CONACYT (clave: 045-N9108) Reporte Final. pp. 28-41.

Satchell, J.E. (ed). 1983. *Earthworms Ecology, from Darwin to Vermiculture.* Chapman & Hall, Cambridge, Inglaterra. 283-296 pp.

Taboga, L. 1980. The nutricional value of earthworms for chickens. *British Poultry Science.* 21:405-410.

Tacon, A.G., E.Stafford, y C.Edwards. 1983. A preliminary investigation of the nutritive value of three terrestrial lumbricid worms for rainbow trout. *Aquaculture*. 35: 187-199.

Tomati, V. A., E.Grapelli, Galli, y W.Nizi, 1983. Fertilizer from vermiculture as an option for organic wastes recovery. *Agrochemestry*, 27: 244-251.

Toscano, S.S. (en prep). Evaluación del crecimiento de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Billard, 1989) utilizando lombrices *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) como sustituto parcial de proteina en el rancho "El Roble", Coatepec, Ver. (Tesis profesional), Instituto Tecnológico del Mar, Boca del Río, Veracruz, México.

Van Gansen, P. 1962. Structures et fonctions du tube digestif du lombricien *Eisenia foetida* Savigny. *Journal de Microscopie*, 1, 1-363.

Velásquez, B.L., C.Herrera y B.Ibañez, 1986. Harina de Lombriz. I parte: Obtención, composición química, valor nutricional y calidad bacteriológica.*Alimentos*, 2(1):15-20.

Zuluaga, V.J. 1989. Utilización integral de los subproductos del café. *en:* Roussos, R., R. Licona, M.Gutierrez (*eds.*). *Memorias del I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera*. ORSTOM-UAM-INMECAFE, Xalapa, Ver. México. pp. 63-65

PROCESAMIENTO DE FRUTOS DE CAFÉ POR VIA HUMEDA Y GENERACION DE SUBPRODUCTOS.

Jaime Zuluaga Vasco

Gerente T E C O L-Tecnologías Ecológicas Colombianaserros de la Alhambra # 81. Manizales-COLOMBIA.
Telefax: 68-745790.

RESUMEN

En Colombia el proceso de beneficio del café se ha hecho tradicionalmente por vía húmeda y este es uno de los factores a los cuales se debe la excelente calidad del café Colombiano. No obstante, en este proceso se consumen grandes volúmenes de agua limpia y se contaminan cantidades equivalentes. La situación actual en la zona cafetera, caracterizada por una deficiencia de agua para las labores de beneficio, la necesidad de procesar cada vez volúmenes más grandes y una conciencia creciente sobre los problemas de contaminación, hacen necesario un replanteamiento del manejo del agua y de los subproductos en el proceso de beneficio húmedo de café.

La producción de café, durante los últimos años en Colombia, ha sido del orden de 12 millones de sacos de 60 kilos de café verde, equivalentes a 720.000 toneladas. La pulpa y el mucílago principales subproductos del proceso de beneficio húmedo de café, generan 350.770 toneladas de materia seca. Si estos subproductos no son utilizados o dispuestos convenientemente se convierten en una fuente de contaminación del medio ambiente.

Los conocimientos actuales permiten plantear el desarrollo de un proceso integral para la valorización de los subproductos del proceso de beneficio húmedo del café, apoyándose en la racionalización del uso del agua en el proceso (abolición del agua como vehículo de transporte) y en procesos de fermentación en medio sólido (ensilaje de la pulpa, producción de hongos comestibles sobre pulpa, cultivo de lombriz roja Californiana utilizando la pulpa como sustrato) y en medio líquido (Biodigestión Anaeróbica, en fases separadas, del mucílago disuelto en las aguas residuales del lavado del café). La aplicación de los anteriores desarrollos permite reducir ocho veces el consumo de agua necesario para el proceso y producir proteína vegetal (hongos comestibles), proteína animal (lombrices), productos mejoradores de las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo (lombricompuesto), alimento para animales (pulpa residual del cultivo de los hongos), combustible (biogas) y productos con propiedades fertilizantes (lodos y efluentes de la biodigestión anaeróbica). Los procesos biotecnológicos están brindando cada vez más y mejores oportunidades para el aprovechamiento integral y rentable de los subproductos de los procesos agrícolas, pecuarios y de producción de alimentos; contribuyendo así a mejorar la rentabilidad de los procesos de producción y evitando la contaminación del medio ambiente.

1. LA RECOLECCION DEL FRUTO DEL CAFE

En la práctica la maduración de los frutos se evidencia por el cambio de color, para el caso del café, este cambio es del verde al rojo cereza o amarillo, dependiendo de la variedad cultivada.

Después de la maduración total los frutos entran en un periodo en el que el catabolismo predomina sobre el anabolismo iniciándose la fase de senescencia. En esta fase hay fermentaciones con producción de alcoholes y ácidos indeseables, ruptura de la estructura de la pared celular por modificaciones en las pectinas, celulosas, hemícelulosas y ligninas; oscurecimiento de la pulpa debido a oxidaciones de pigmentos y pudrición. En consecuencia la calidad de los frutos tiende a disminuir marcadamente.

Ha sido ampliamente demostrado que la mejor calidad de café, tanto del grano como de la infusión, se obtiene cuando el fruto es cosechado en su estado de óptima madurez. En este estado la composición química, tanto cualitativa como cuantitativa, se encuentra en su punto óptimo permitiéndole al fruto la expresión de su máxima calidad. GARRUTI y GOMEZ en el Brasil (in 1) observaron que los cafés cereza maduros (despulpados y no despulpados) presentaron calidad de bebida superior (suave) a la de los frutos cosechados verdes (bebida "muy dura").

Los frutos verdes presentan algunos compuestos químicos en niveles diferentes al ideal, presentado por los frutos maduros, lo cual se refleja en las características organolépticas de la bebida. De manera similar los frutos secos en el árbol o recogidos del suelo son materiales que ya han comenzado su fase de senescencia; con la consecuente ruptura de la membrana celular y presencia de compuestos químicos derivados de

procesos fermentativos o del ataque de microorganismos.
En general las condiciones de alta humedad del suelo, la sobremaduración y el paso del estado de cereza verde a fruto seco pueden provocar degradación de la membrana y favorecer las fermentaciones y las infecciones microbianas.
TEXEIRA et al (in 1) determinaron que mezclas de café normal con porcentajes superiores al 15% de granos verdes o fermentados así como superiores al 10% de granos negros, perjudican sensiblemente la calidad de la bebida.
De acuerdo con CHOUSSY (in 1) la intensidad de la alteración en la composición química de los granos, debida a causas fisiológicas o microbiológicas, está en relación con las diferentes condiciones climáticas de las distintas regiones de cultivo y en consecuencia, para éstas donde las condiciones ambientales son altamente favorables a los ataques de microorganismos, los frutos deben ser cosechados a mano, en su estado de óptima madurez; rápidamente despulpados, fermentados, lavados y secados artificialmente en dispositivos mecánicos.
Para la obtención de un café de excelente calidad es condición indispensable la ejecución de una recolección racional; entendiéndose por esto el cosechado manual de únicamente cerezas maduras y sanas. El beneficio de una mezcla de cerezas verdes, amarillo verdosas, anaranjadas, rojas y negras sólo puede producir una calidad heterogénea tanto en el color de la almendra como en las propiedades gustativas de la infusión.
Durante el despulpado el grano verde se rompe, debido a la ausencia de la propiedad lubricante que proporciona el mucílago del café maduro y se origina el grano partido *y/o* mordido. Además, como aún no están formados los azucares, la fermentación no se lleva a cabo normalmente y se produce una descomposición que genera malos olores para la totalidad de la masa de café.
Las cerezas de color amarillo verdoso y sobre todo verde dan una almendra de coloración defectuosa (grano decolorado) y una bebida áspera y picante. Las cerezas sobremaduras de color rojo-vinoso, producen una bebida con sabor a fruta ("fruty") e incluso a levadura ("yeasty"). Por su parte las cerezas negras, parcialmente desecadas en el árbol, originan un café pergamino con parte de la pulpa adherida (grano media cara) y una almendra de color apagado (grano decolorado) asi como una infusión con sabor a madera

2. MORFOLOGIA DEL FRUTO DEL CAFÉ.

El fruto del caté tiene el mismo aspecto exterior que el de una cereza y por esta razón, comúnmente, se le denomina con este nombre. Un corte longitudinal del fruto (Esquema 1 A de la Figura 1) muestra las diferentes capas celulares.
Se observa que la pulpa está constituida por el exocarpio (Epidermis) y parte del mesocarpio. El color de la epidermis depende de la variedad de café y del estado de madurez del fruto y varia de verde a rojo; teniendo a veces tonalidades rojo oscuro, violeta y aún negro. El mesocarpio se encuentra protegido por la epidermis y está constituido por una capa gruesa de tejido esponjoso de, aproximadamente 5 mm de espesor, rico en azúcares y mucílagos y a su vez envuelve dos granos opuestos por su cara plana.
Los granos están revestidos por una doble membrana:la primera llamada pergamino, de color amarillo pálido y de consistencia dura y frágil, la segunda,mucho más fina que la anterior y adherida al grano (Albumen), es llamada película plateada (Tegumento Seminal). En la base de [os granos, sobre la cara interna, se encuentra el germen (Embrión).
La observación microscópica del corte longitudinal, muestra en detalle cada una de las partes mencionadas anteriormente (Esquema 1 B).Este corte permite observar que la pulpa no está constituida solamente por el exocarpio y el mesocarpio sinó, además, por otras tres capas de tejido celular: células en empalizada, células longitudinales del esclerénquima y células transversales del esclerénquima. La película plateada está constituida a su vez de tres capas: epidermis, capa media y células comprimidas. En el grano se puede observar el tejido de reserva parenquimatoso y el material graso.

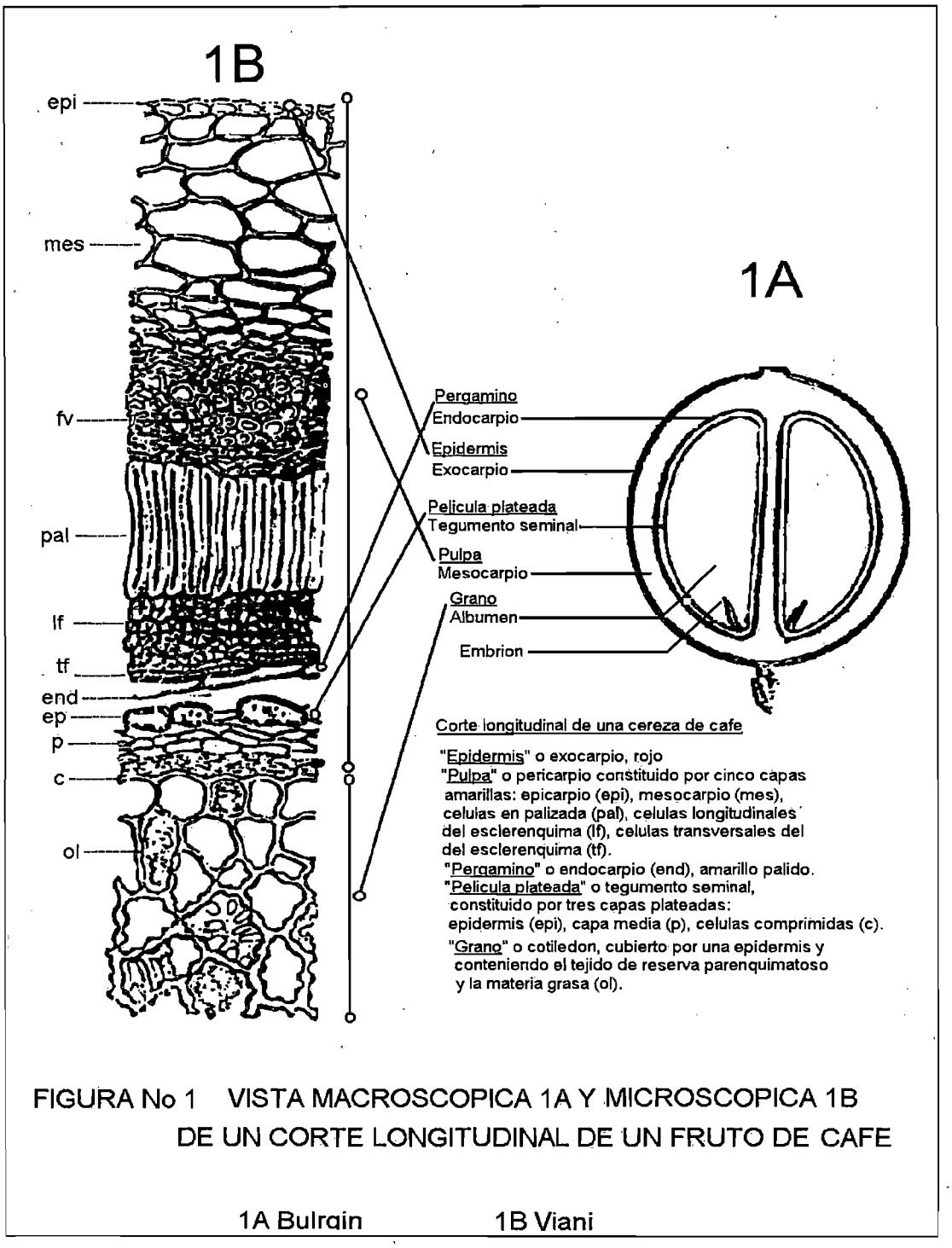


FIGURA No 1 VISTA MACROSCOPICA 1A Y MICROSCOPICA 1B DE UN CORTE LONGITUDINAL DE UN FRUTO DE CAFE

1A Bulrain 1B Viani

3. MACROCOMPONENTES DE LA CEREZA DEL CAFE.

El estudio de la distribución en porcentaje de los macrocomponentes de la cereza de café, Figura 2, procesada hasta la obtención de la infusión, permite constatar que sólo el 6% del peso del fruto fresco es utilizado para la preparación de la bebida. El 94% restante, constituido por agua y subproductos del proceso, en la mayoría de los casos no es utilizado y se convierte en una fuente de contaminación del medio ambiente. Se observa que durante el proceso de beneficio húmedo del café se generan dos subproductos: la pulpa que constituye el 39% del peso del fruto fresco y el mucilago que representa el 22%.

Balances de este mismo tipo realizados por otros investigadores, BRESSANI y colaboradores (3), expresados en base seca, muestran que la pulpa constituye el 28.7% de la materia seca de la cereza, el mucílago el 4.9%, la cascarilla o pergamino el 11.9% y el grano el 55.4%.

De acuerdo con AGUIRRE (4) esta distribución, en base seca, varia ligeramente entre variedades de café. Para el caso de *Coffea arabica L.* variedad Típica y variedad Bourbón la pulpa representa e26.5% y 29.6%, respectivamente, el mucilago el 13.7% y 7.5%, la cascarilla el 10% y 11.2% y el grano el 50% y 51.7%. Es de esperarse que las condiciones climáticas y culturales también tengan una influencia sobre esta distribución.

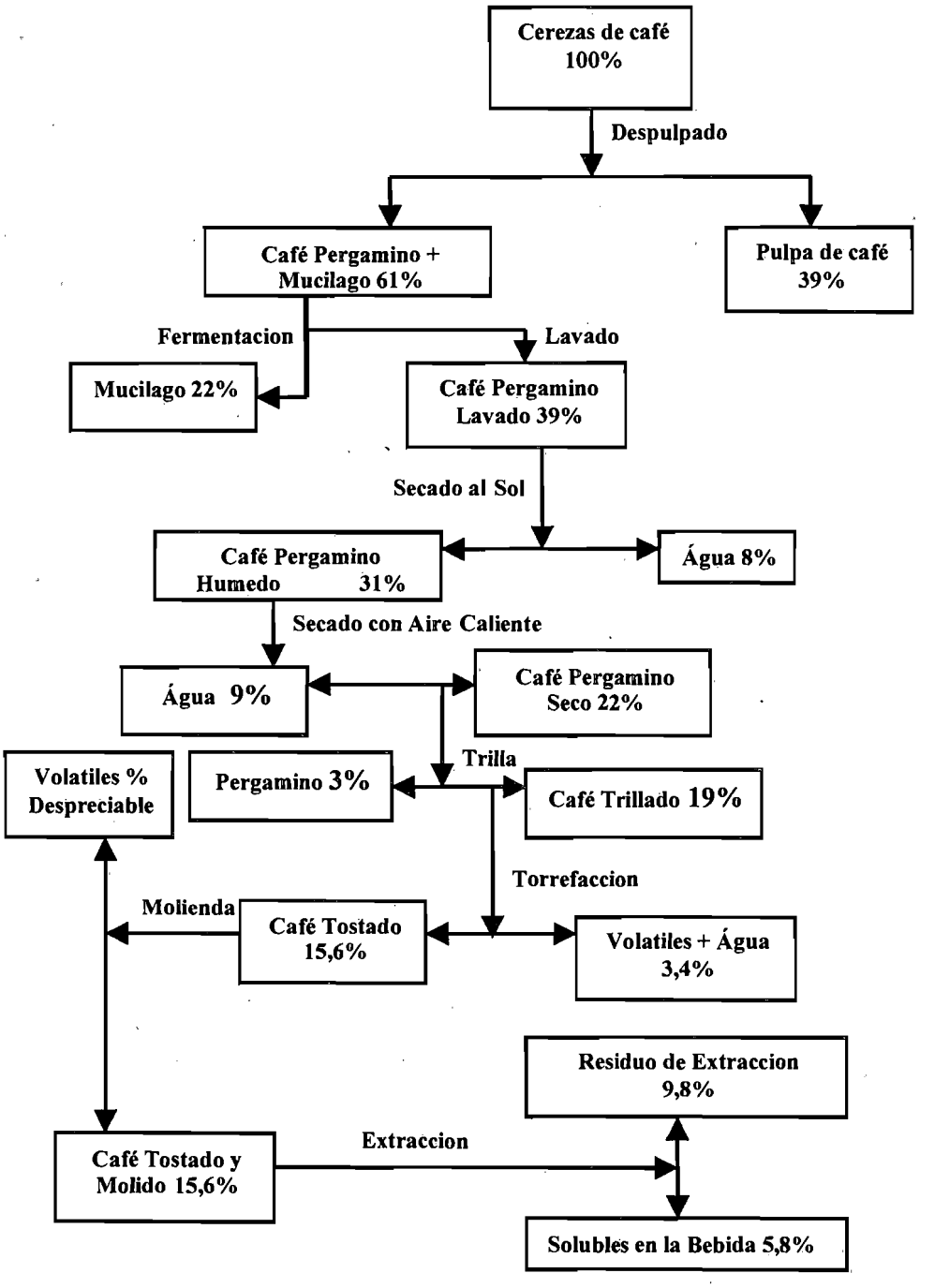


Figura 2.-Distribución en porcentajes de los macrocomponentes de la cereza del café (5).

4. COMPOSICION QUIMICA DE LOS SUBPRODUCTOS DEL FRUTO DEL CAFÉ..

4.1. Composición química de la pulpa de café.

Tabla 1.-Composición química proximal de la pulpa de café deshidratada (5).

NUTRIMENTO	PULPA DESHIDRATADA
Cenizas	8.12%
Extracto etéreo	2.50%
Extracto libre de nitrógeno	59.10%
Fibra cruda	15.10%
Fósforo	0.05 %
Hierro ppm	250
Humedad	6.93%
Materia seca	93.07%
Nitrógeno	1.32%
Potasio	3.17%
Proteína (Nx 625)	8.25%
Sodio ppm	1 60
Taninos	3.70%
Cafeína	0.75%
Calcio	0.32%
Carbohidratos*	74.10%
*Carbohídratos = Extracto libre de N + fibra cruda	

El color verde del fruto inmaduro de café es debido a la clorofila y el color rojo, cuando está maduro, es debido a compuestos del tipo de las antocianinas.

La tabla 1 muestra de un análisis químico proximal de la pulpa de café. Se nota un contenido importante en hidratos de carbono, fibra cruda, cenizas y proteínas. También se observa un contenido no despreciable de cafeína, taninos, ácido clorogénico y ácido cafeico.

El contenido de nutrimentos de la pulpa de café es superior al de la cáscara de cítricos, material utilizado ampliamente en la alimentación de rumiantes.

La determinación, por cromatografía de gases, de los azucares libres en la pulpa de café, *Coffea arabica* L., variedad Típica rojo, muestra la presencia de α+β-D-Fructuosa, α+β-D-Glucosa, D-Galactosa, Sacarosa e Inositol. Los resultados cuantitativos se observan en la Tabla 2.

Los resultados de la determinación cuantitativa de las diferentes clases de compuestos fenólicos, Tabla 3 , para dos muestras de *Coffea arabica* L., variedad Típica rojo, secadas por liofilización y por exposición al sol, respectivamente, muestran la ausencia de taninos en la pulpa fresca (liofilizada) y un contenido de 2.07% en la pulpa secada al sol. El total de los compuestos fenólicos en la pulpa fresca es de 6.29% y en la pulpa secada al sol de 6.62% (expresados como ácido gálico por cada 100 mg de pulpa fresca). Esta diferencia se explica por la hidrólisis de glicósidos fenólicos en la pulpa

Tabla 2.-Contenido de azucares libres de la pulpa de café (5).

Azúcares	Liofilizada		Secada al sol	
	mg/100 mg	%/ total	mg/100 mg	%/ total
α+β-D-Fructuosa	9. 92	43. 80	15. 20	57.10
D-Galactosa	2. 40	10. 60	1. 88	7. 00
α-D-Glucosa3.42	15. 10	4. 52	17. 00	
β-D-Glucosa	3. 42	15. 10	3. 11	11. 70
Inositol	0. 28	1. 2	0. 1	0. 4
Sacarosa	3. 21	14. 20	1. 83	6. 80
Total	22. 65		26. 64	

TABLA 3.-Contenido fenólico de la pulpa de café (5).

Tipo de Secado	Fenoles totales	Fracciones no taninas			Fracciones taninas		
		Fenoles %	Flavonoides simples	Total	Conden-sados	Hídroli-zables	Total
Liofilizada	6.29	2.28	4.01	6.29	0	0	0
Secada al sol	6.62	1.72	2.83	4.55	1.64	0.43	2.07

Tabla 4.-Composición química del mucílago del café (1 3)(6).

Componente	Nadal % Base húmeda	Bressani % Base seca
Sustancias pécticas totales		35.80
Azúcares totales	4.10	45.80
Azúcares reductores		30.00
Azúcares no reductores		20.00
Celulosa + cenizas		17.00
Agua	84.20	
Proteína	8.90	
Acido péctico	0.91	
Cenizas	0.70	

Secada al sol. La diferente distribución de los fenoles simples y de los flavonoides, en las dos muestras, explica la formación de los taninos hidrolizables y condensados, respectivamente. En particular, la formación de los taninos condensados explica el cambio de color de la pulpa, de rojo a café oscuro, por polimerización de las antocianidinas; compuestos responsables del color rojo de la cereza.

4.2. Composición química del mucilago.

Desde el punto de vista físico el mucílago es un hidrogel. Químicamente, el mucílago contiene agua, pectinas, azucares y ácidos orgánicos. De acuerdo con AGUIRRE (4), el mucilago no contiene ni cafeína ni taninos. Durante la maduración del fruto del café, el pectato de calcio y las protopectinas son convertidos en pectinas por acción de las enzimas pectinolíticas. La Tabla 4 muestra la composición química del mucílago reportada por varios autores.

5. EL PROCESO DE BENEFICIO HUMEDO DE CAFÉ.

5.1. Aspectos generales.

5.1.1. Antecedentes.

El beneficio del café en Colombia se hace, de manera tradicional, desde hace mas de 1 50 años y han sido muy pocos los cambios que se le han incorporado desde entonces.

La cantidad y la calidad del agua disponible, la falta de una infraestructura vial adecuada y la carencia de energía eléctrica en la zona cafetera, así como, la poca conciencia en relación con los problemas de contaminación generados; determinaron en el pasado que el proceso fuese fundamentalmente hidráulico. En este momento, para un gran porcentaje de las 300.000 familias que cultivan el café en Colombia, todas estas características han cambiado y dado el progreso agronómico en el cultivo, la producción se ha por lo menos duplicado y en consecuencia, se impone una nueva orientación para el proceso de beneficio húmedo de café más acorde con las circunstancias.

5.1.2. Producción de café en Colombia.

De acuerdo con el censo cafetero 1980-81 (8), la capacidad potencial de producción del país, en cargas de 125 kilogramos de café pergamino seco (cps), es de 8.930.617. Esto equivale a 1.116.237 toneladas de cps que a su vez provienen de 5.023.472 toneladas de café en cereza (cc) (teniendo en cuenta que 4.5 kilos de cc producen 1 kilo de cps; de acuerdo con URIBE (9)).

La producción para el año cafetero 1990-91 fué de 14.400.000 sacos de 60 kilos de café verde (cv)= 864.000 toneladas de cv= 1.080.000 toneladas de cps= 4.803.840 toneladas de cc.

5.1.3. Consumo de agua en el proceso de beneficio húmedo de café.

El volumen promedio de agua utilizado en el beneficiado de un kilogramo de cps es de 40 litros (10) (aproximadamente 20 lts en el despulpado y 20 lts en el lavado), lo que equivale a 8.3 metros cúbicos de agua por tonelada de cc y a 42.754.176 metros cúbicos de agua para procesar la cosecha cafetera de 1990-91.

5.1.4 Equivalente de contaminación en el beneficio del café.

DQO promedio excretada por un habitante/día = 67 grs. (11). DQO total de la pulpa generada por un Kg de cc = 84.8 grs. DQO total del mucílago generado por un Kg de cc = 30.3 grs.

DQO total generada en residuos orgánicos por un Kg de cc beneficiado= 115.1 grs.

Equivalente de contaminación por Kg de cc beneficiado 1.7 habitantes /día = 1718 hab./día por tonelada de cc beneficiado.
Equivalente de contaminación de la cosecha cafetera colombiana 1990/1991 8.252.997.120 hab./día 22.610.951 hab./año.

5.2. El proceso.
El tipo de proceso al cual se somete el fruto del café después de la recolección depende en gran medida de la especie y variedad de café cultivado, de la disponibilidad de agua y sobre todo del tipo de recolección practicada.
Normalmente los cafés arábicos, recolectados racionalmente (recolección manual de frutos maduros y sanos), son beneficiados por vía húmeda y dan origen a las bebidas suaves de más alta calidad pero generan contaminación del medio ambiente.
El 40.6% del mercado mundial del café corresponde a los cafés suaves lavados producidos en Colombia, Kenia, Tanzania, México, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, Nicaragua, Venezuela, Ecuador, Perú, Ruanda, Burundi, India y Australia (12).
En el proceso de beneficio húmedo propiamente dicho, se efectúan básicamente en tres etapas a saber:
A.-El despulpado.
B.-La fermentación.
C.-El lavado y clasificación.

La operación de secado, la cual es común para el beneficio seco y húmedo, no hace parte realmente del proceso húmedo (donde se consume agua).En la Figura 3se observa un esquema de las instalaciones típicas para la realización de las diferentes operaciones de un proceso de beneficio húmedo de café

5.2.1.-La etapa del despulpado.
En esta etapa se remueve el epicarpio (pulpa) y parte del mesocarpio (mucilago) del fruto, con el fin de favorecer una aceleración del proceso de descomposición del mucilago y evitar el manchado del café pergamino por difusión de los pigmentos antociánicos presentes en el epicarpio del fruto.
La pulpa constituye aproximadamente el 40% del fruto fresco y el 29% en base seca, presentando un contenido de humedad del 77% (5, 13).
En la operación de despulpado se pueden originar daños químicos por retardo en la ejecución o daños mecánicos por mal uso de la máquina despulpadora.
Durante el desarrollo del fruto del café en el árbol, los azúcares, principalmente la galactosa, se oxidan a ácidos galacturónicos que por deshidratación producen anhídridos los cuales se polimerizan dando origen a las sustancias pécticas. A estas sustancias, dependiendo de su peso molecular, se les conoce como protopectinas, pectinas y ácidos pécticos.

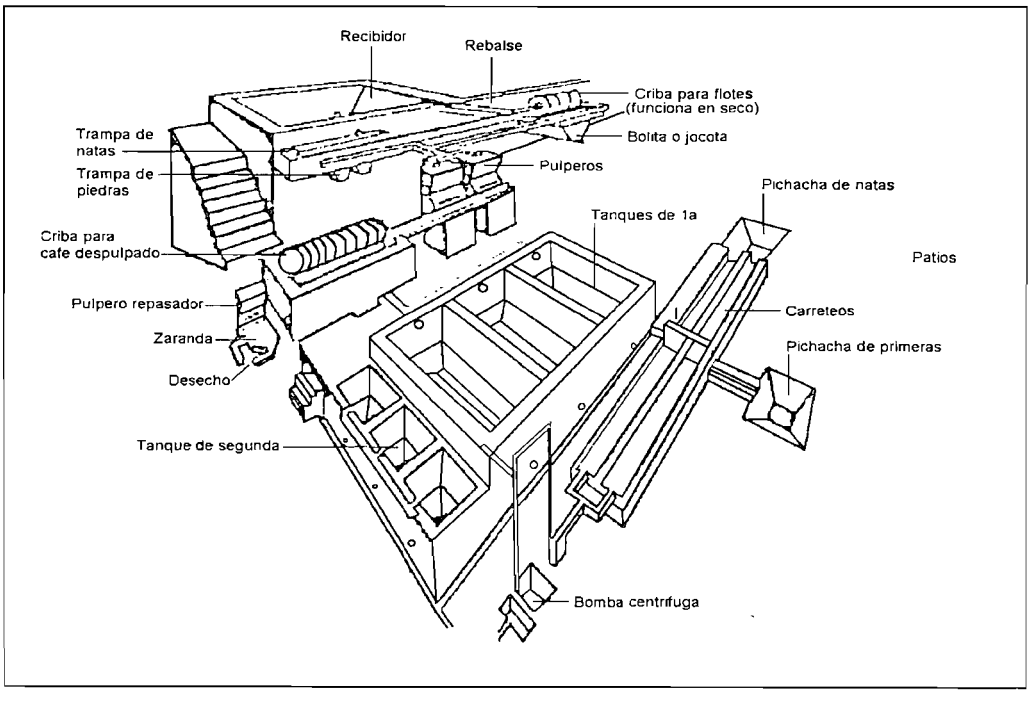


FIG. 3. Instalaciones típicas para un proceso de beneficio húmedo de café (7).

La descomposición de estas sustancias pécticas, por hidrólisis enzimática durante la maduración del fruto, es lo que da origen al mucílago y a las mieles, las cuales cumplen una función lubricante durante el despulpado.
La ausencia de mucílago en el fruto, por falta de madurez o por resecamiento en el árbol, no permite una adecuada y completa remoción de ¡a pulpa lo que da origen al defecto conocido como grano media cara.
Una adecuada y oportuna calibración del ajuste de la despulpadora, sobre todo al comienzo y en el grueso de la cosecha, es necesaria para evitar la aparición del grano mordido y el grano aplastado.
Las heridas causadas en el grano permiten la mezcla y reacción de los constituyentes químicos solubles presentes intra y extracelularmente, así como las oxidaciones debidas al oxígeno del aire.
Lo anterior explica la aparición de un color negro, en el borde de las heridas de los granos, por oxidación de compuestos principalmente del tipo fenólico.
De igual manera estas heridas favorecen el ataque de microorganismos (hongos y bacterias) los cuales a su vez producen compuestos químicos extraños al café verde.
Los daños físicos causados al café verde tienen su efecto sobre la calidad del proceso de torrefacción al no presentar la almendra una matriz uniforme para los intercambios de calor y los efectos de las presiones desarrolladas durante la pirólisis.
Los granos con daños físicos frecuentemente se carbonizan debido a que las reacciones pirolíticas ya no ocurren dentro de la celula y en ausencia de aire sino en contacto directo con esta.
Todas estas reacciones cambian la composición química del café verde y en consecuencia las propiedades organolépticas de la infusión preparada con éste.

5.2.2. La etapa de la fermentación.

En este proceso se descompone el resto del mesocarpio, mucilago, que no fue retirado en la operación de despulpado, con el fin de permitir su remoción en la operación de lavado y facilitar los procesos de secado y almacenamiento del grano.
El mucilago constituye aproximadamente el 22% del peso del fruto fresco y el 5% en base seca, presentando un contenido de humedad del 85 al 90% (5, 13).
De acuerdo a COSTE (21), la descomposición de las sustancias pécticas, de la envoltura mucilaginosa del grano, es atribuida a una acción diastásica acompañada de una fermentación láctica; pero sin llegar a producir fermentaciones secundarias (acética, propiónica, butírica-pútrida) nocivas para la calidad del producto.
Mediante "pruebas de taza" se ha determinado que la fermentación correctamente efectuada no tiene influencia sobre la calidad de la bebida. Sin embargo, se ha observado que el sabor ligeramente ácido de ciertos cafés arábica, muy apreciados por los consumidores, se obtienen mediante una fermentación de cierta duración. WILBAUX (22), observó que la fermentación bajo agua mejora ligeramente la calidad de los cafés finos al producirse una mayor cantidad de ácidos; especialmente láctico.
Normalmente los daños en la calidad del café, generados en el proceso de fermentación natural, son debidos a largos perlados de fermentación(superiores a 24 horas). En la zona cafetera Colombiana la fermentación del café recolectado en su punto óptimo de madurez demora entre 12 y 20 horas (dependiendo de la altura sobre el nivel del mar, al cual se encuentren las instalaciones de beneficio, lo cual determina en gran medida la tempertura ambiente).
La velocidad de hidrólisis (descomposición) del mucilago, depende de la temperatura de la masa de café en fermentación y del grado de madurez del fruto; lo cual a su vez determina el contenido de enzimas pectinolíticas y la cantidad de azúcares.
El mucilago se forma en el fruto del café cuando éste ha alcanzado un buen nivel de madurez y se encuentra ausente en los frutos verdes y resecos en el árbol.
La hidrólisis y fermentación de los compuestos que forman el mucílago (pectinas y azúcares principalmente) se lleva a cabo por una acción combinada de las enzimas naturales del fruto y de los microorganismos presentes en el café y en el tanque de fermentación.
De acuerdo a PICADO (20), todos los microorganismos capaces de atacar las sustancias orgánicas pueden llevar a cabo la transformación del mucílago; pero la calidad del café: color, olor y sabor; varian con el tipo de microorganismo que ha intervenido en esta transformación. Los microorganismos pueden ser útiles, perjudiciales o inocuos.
Después del despulpado, el café en baba queda expuesto a microorganismos tales como levaduras hongos y bacterias que al encontrar condiciones favorables para su desarrollo infectan el grano. Estos microorganismos producen sus propias enzimas las cuales actúan principalmente sobre los azúcares oxidándolos y produciendo alcoholes y ácidos, al tiempo que se eleva la temperatura de la masa de café por el calor generado en estas reacciones. Algunos de los compuestos que se forman durante la fermentación del café, son: el

alcohol etílico, el cual a su vez es oxidado a ácido acético y el ácido láctico.
FRITZ (23), estudió las reacciones que se producen en el curso de la fermentación y observó:
1.-Una fermentación alcohólica muy activa, con desprendimiento de C02, entre las 7 u 8 primeras horas.
2.-Una fermentación láctica, que comienza hacía la segunda o tercera hora y se mantiene activa hasta la 24-ava hora.
3.-Una fermentación acética que comienza hacia la 11 -ava hora, presentándose muy activa entre la 12 y 1 8-ava hora; para luego disminuir de intensidad.
4.-Una fermentación butírica, que comienza entre la 20 a 24-ava hora; cuando la masa mucilaginosa se junta en el fondo de la cuva de fermentación.
Cuando la fermentación es muy prolongada, la infección por los microorganismos se torna importante y comienzan a aparecer daños en la calidad, por la formación de compuestos responsables de sabores y olores indeseables como ácidos propiónico y butírico. La fermentación butírica es la fase pútrida de la etapa de fermentación y prosigue su curso en las aguas de lavado, dando orígen a las emanaciones nauseabundas en los beneficiaderos.
Todos los daños de calidad causados al grano por fermentaciones prolongadas (sobrefermentaciones) son de tipo químico y en consecuencia se reflejan directamente en las propiedades organolépticas de la bebida. También hay efectos sobre la apariencia del producto (cambio de color-decoloramiento).
La gravedad del daño depende del tiempo de sobrefermentación lo cual determina la aparición de toda una gama de granos fermentados con olores y sabores indeseables ("off-flavours"), tales como: fruta (piña), cebolla (ácido propiónico), agrio (vinoso), típico fermento (ácido acético), queso (vinagre penetrante) y "stinker" (podrido).
El grano "stinker" puede considerarse como el último estado del grano sobrefermentado y se caracteriza por su color tabaco, producción de vapores ácidos y expulsión del embrión. Este defecto tiene especial importancia por la capacidad que tienen los granos afectados de dañar grandes cantidades de granos que se encuentren a su alrededor. El origen de estos granos y su composición química ha llamado la atención de varios investigadores; por ejemplo BOREL et al (14) han realizado estudios por CG/EM (cromatografía de gases/espectrometría de masas) lo cual les ha permitido pensar que muchos de los compuestos presentes en el grano "stinker" provienen de fermentaciones por enterobacterias. Así mismo, CHALOT (15) dice que la aparición de los granos "stinker" parece ser la consecuencia de malas condiciones de proceso: almacenamiento prolongado de las cerezas antes del despulpado, despulpado con agua sucia, almacenamiento del café después de un secado insuficiente.
Todos los daños ocasionados a la calidad del café durante el proceso de fermentación son de importancia económica puesto que provocan rechazo del producto por parte de los compradores. No obstante, estos problemas pueden ser fácilmente evitados practicando una recolección selectiva del fruto maduro y sano, despulpando inmediatamente después de la recolección, determinando oportunamente el "punto de lavado" (fin del proceso de fermentación) y lavando bien el grano con agua limpia.

5.2.3. La etapa de lavado.

En la etapa de lavado se retiran todos los productos de la hidrólisis y fermentación del mucílago, con el fin de evitar la formación de sabores y olores indeseables en la etapa de secado y en el proceso de almacenamiento.
Hay dos condiciones que deben cumplirse para asegurara un buen lavado del café: que la etapa de fermentación haya sido suficiente (completa hidrólisis del mucílago) y que el agua empleada en la operación sea limpia. Si la primera condición no se cumple quedan restos de mucilago, sobre todo a nivel de la hendidura del café pergamino, el cual continua su descomposición en la etapa de secado y puede generar café fermentado o servir como sustrato para el desarrollo de microorganismos, principalmente hongos, durante el proceso de almacenamiento, produciendo café con el pergamino manchado y con sabor y olor a moho, generalmente conocidos como cafés sucios. La utilización de aguas sucias genera una serie de defectos en el café que dependen de la fuente de contaminación; por ejemplo sí el agua está polucionada con residuos del beneficio del café, puede originar el café fermentado y aún los cafés "stinker" pero si está contaminada con tierra se producen los cafés con sabor terroso, otro tipo de café sucio. Las aguas ferruginosas comunican al café un sabor metálico.
Las aguas residuales generadas en el beneficio de un kilogramo de café en cereza poseen una capacidad contaminante equivalente a la de una persona por día (11), expresada en Demanda Química de Oxígeno "DQO". Estos costos de contaminación no están siendo suficientemente bien reconocidos, por el mercado internacional, a los países productores de cafés suaves lavados.

5.2.4. La etapa de secado.

El secado del café es una de las operaciones más delicadas del proceso de beneficio que puede tener consecuencias desastrosas sobre la calidad del producto, si no se tienen los cuidados necesarios.

Durante el secado se rebaja la humedad del café del 52% b. h. (humedad natural del café verde) a 10-12% b. h. Esto con el fin de poder almacenar el producto en condiciones que permitan conservar su calidad al disminuir la actividad enzimática y el contenido de agua, lo que impide a su vez el desarrollo de hongos, mohos y bacterias durante el almacenamiento.

El secado puede realizarse naturalmente, secado al sol, ó mecánicamente, mediante dispositivos apropiados para el efecto y provistos de cámaras de combustión y ventiladores para el calentamiento e impulsión del aire. En los dispositivos mecánicos es indispensable la inclusión de un intercambiador de calor para evitar que los gases de combustión entren en contacto con el café y deterioren su calidad.

En algunos países, especialmente en Kenia, se le ha dado gran importancia al secado al sol y algunos investigadores como McCLOY (17) y GIBSON (18) atribuyen el desarrollo del color verde azuloso, de los cafés de alta calidad, a los efectos de la radiación solar durante el secado natural.

Una mala operación de secado puede influir no sólo sobre la apariencia del producto crudo sino sobre el gusto de la infusión. Normalmente los daños en la calidad del café, generados en el secado, son debidos a la utilización de altas temperaturas que inducen cambios en la composición química de la almendra. ARCILA (19) constató daños en el embrión (pérdida del poder germinativo) al usar temperaturas superiores a 45°C en el secado de la semilla.

El principal defecto ocasionado por las altas temperaturas de secado, sobre todo cuando el grano tiene altos contenidos de humedad, es el grano cristalizado; caracterizado por un color gris azuloso y una consistencia frágil y quebradiza.

Muchas de las faltas en el proceso de secado, se manifiestan durante el almacenamiento del producto y son debidas básicamente a un secado excesivo o deficiente.

Una de las primeras características del grano que se ve afectada, por un mal proceso de secado, es el color verde-azuloso típico de los granos de buena calidad. La descomposición de las sustancias responsables de esta coloración da origen al grano blanqueado o decolorado, el cual puede también formarse por problemas diferentes a fallas en el secado. Específicamente por problemas de secado puede formarse el grano decolorado-veteado, debido a rehumedecimiento durante o después del secado y se caracteriza por presentar vetas blancas en la superficie de la almendra.

Otro tipo de grano decolorado, formado en el secado, es el grano decolorado-sobresecado o quemado; el cual es de color ámbar o ligeramente amarillento y es originado por un excesivo tiempo de secado. Por el contrario, una falta de secado da origen al grano flojo el cual se caracteriza por presentar una almendra de color gris oscuro y de consistencia blanda. Este último defecto es particularmente importante por la facilidad con que el grano es utilizado, como sustrato, para el crecimiento de hongos y bacterias; durante el proceso de almacenamiento.

6. BIBLIOGRAFIA

1. -CARVALHO, V. O. de CHALFOUN, S.M. Aspectos qualitativos do cafe. Informe Agropecuario (Brasil) 11(126):79-92; 1985.

2. -VIANI R., Coffee, I-History-Botany-Trade-Processing-Chemistry-Nutritional Value, NESTLE, Lausanne (1979).

3.-BRESSANI., R.; ESTRADA., E.; JARQUIN., R. Pulpa y pergamino de café. I.-Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. Turrialba, 22:299-304. 1972.

4.-AGUIRRE, B. F., La utilización industrial del grano del café y de sus subproductos. Guatemala, Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (Investigaciones Tecnológicas del ICAITI, N^0 1).

5.-ZULUAGA, V.J., Contribution á l'étude de la composition chimique de la pulpe de café *(Coffea arabica* L). Thése de Doctorat es Sciences. Faculté des Sciences, Université de Neuchatel - Suisse. 1981.

6.-NADAL N., G.M. Coffee mucilage, its chemical composition. Coffee and Tea Ind. 82 (N^0 8): 17-18.1959.

7.-ASOCIACION NACIONAL DEL CAFE "ANACAFE". Guatemala. Manual Práctico de Beneficio de Café. Boletín N° 13, 1973, 96 p.

8.-FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. División de Investigaciones Económicas. Departamento Censo Cafetero. Censo Cafetero Nacional 1980-81. pp.24.

9.-URIBE H., A. Constantes físicas y factores de conversión en café. Avances Técnicos. CENICAFE (Colombia). Abril 1977. N^0 65.

10.-FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. Manual del

Cafetero Colombiano. Cuarta Edición 1979. pp. 168.

11.-ARCILA Ó.,F. Contaminación por residuos del beneficio húmedo de café. Curso sobre Cálculo y Diseño de Beneficiaderos de Café. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Bogotá, 1986. (Mimeografiado).

12.-CHALARCA., J. El café en la vida de Colombia. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Bogotá, 1987.

13.-BRESSANI., R. Subproductos del fruto del café. In: BRAHAM., J. E.; BRESSANI., R. (eds.) Pulpa de café: Composición, tecnología y utilización. Guatemala, Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, INCAP-CIID, 1 978. p.9-1 7.

14.-BAREL, M.; CHALLOT., F.; VINCENT., J.C. Contribution á l'étude de féves de café defecteuses. Café, Cacao, Thé (Francia). 20(2): 1 29-134. 1976.

15.-CHALLOT., F. Recherche sur l'origine des feves puantes chez *Coffea arabica.* Café, Cacao, Thé. (Francia). 29(3):201-208. 1976.

16.-GUYOT., B.; CROS., E.; VINCENT., J.C. Caractérisation et identification des compsés de la fraction volatile d'un café vert arabica sain et d'un café vert arabica puant. Café, Cacao, Thé. (Francia). 26(4);279-288. 1982.

17.-McCLOY., J.F. Mechanical drying of arabica coffee. Kenya Coffee (Kenia) 24(280):1 17-133. 1959.

18.-GIBSON., A. Phototechnical aspects of drying East African arabica coffees. In: Colloque Scientifique International sur le Café, 5. Lisbonne (Portugal) 1 4-1 9 Juin 1971. Paris (Francia), ASIC, 1971. p.[24]6-[25]8.

19.-ARCILA P., J. Influencia de la temperatura de secado en la germinación de las semillas de café. CENICAFE (Colombia) 27(2);89-91. 1976.

20.-PICADO T., C. Méthodes biologiques d'amelioration du café. Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale 16 (177); 367-372. 1936.

21.-COSTE, R. Beneficiado de cafés verdes. In: Coste, R. Cafetos y cafés en el mundo. Paris, Maisonneuve y Larose, 1954 y. 2, p. 9-101.

22-WILVAUX, R. Beneficio del café. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 1972. 231 p.

23.-FRITZ, A. El beneficio del café sin fermentar. Revista Agricola (Guatemala) 11 (6);2 85-290. 1933.

POTENCIALIDADE DE USO DE RESÍDUOS E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO AGROINDUSTRIAL DO CAFÉ

Celso Luis Rodrigues Vegro [1],Flavio Condé de Carvalho [2]

[1] Engº Agrº Instituto de Economia Agrícola da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de SP.
[2] Engº Agrº DS. Professor Titular da Fundação Armando Alvares Penteado - SP.

1 - INTRODUÇÃO

Em decorrência da abertura comercial, cria-se ambiente de crescente competitividade e de exigências com preservação do meio ambiente, passando as firmas a se preocupar com o aproveitamento de resíduos e subprodutos gerados pela sua atividade de transformação.

O processamento da safra brasileira de café de 1998/99 resultou em 2,1 milhões de toneladas de cascas, 310 mil toneladas de borra esgotada de café solúvel e liberou à atmosfera 561 mil toneladas de monóxido de carbono.

O objetivo deste estudo é relacionar e discutir os principais usos dos resíduos do processamento agroindustrial do café.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

A estimativa da produção brasileira de café na safra 1998/99 baseou-se nos números elaborados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (SAFRA, 1999). Para a quantificação dos resíduos e subprodutos, foram usados os seguintes coeficientes: 1kg de café beneficiado produz quantidade equivalente de cascas; 1kg de café solúvel produz 1,5kg de borra esgotada (CLAUDE, 1979 citado por VEGRO & CARVALHO, 1994); 1kg de café torrado e moído produz 850mg de monóxido de carbono (DALLA ROSA, M. et al, 1982).

Os principais usos dos subprodutos e resíduos foram pesquisados na literatura, incluindo pesquisa na Internet.

3 - RESULTADOS

Os tipos de utilização mais freqüentemente sugeridos incluem:

Combustível: Com poder calorífico de 3.500 kcal/kg, as cascas de café podem permitir autonomia energética a uma instalação de secagem de grãos e fornecimento de energia para fins diversos. A transformação de cascas em **Carvão** reduz os custos de transporte, concentrando a energia do resíduo. Briquetes: no Quênia, briquetes de cascas de café são comercializadas para uso local e exportação para a Europa. A borra úmida tem o mesmo poder calorífico da casca, requerendo secagem prévia até apresentar 33% de umidade (CLAUDE, 1979; ADAMS & DOUGAN, 1987; INTERNATIONAL, 1995).

Adubo orgânico: As cascas são adicionadas diretamente ao solo ou mediante compostagem (pisoteamento e mistura com esterco em currais ou esparramação como cama nos galpões de criação de aves). Podem, ainda, ser enriquecidas com mistura de minerais e adubos químicos. A borra do solúvel apresenta alguns inconvenientes nesse uso, devido ao alto índice de acidez, além da propensão à impermeabilização do solo (CLAUDE, 1979; TANGO, 1971; BARCELOS, et al, 1992 e NOGUEIRA & FLORES, 1988).

TABELA 1 – Quantidades de nutrientes por tonelada de resíduo do processamento agroindustrial do café
(em kg)

Nutriente	Casca de café	Borra de solúvel
Nitrogênio	17,5	32
Fósforo	1,4	...
Potássio	37,4	...
Cálcio	4,2	15
Magnésio	1,2	10
Enxofre	1,5	...

Fonte: Elaborado a partir de MALAVOLTA & COURY (1967) e MUZILLI (1982).

Tendo como referência o volume total de cascas gerado pela safra de 34,5 milhões de sacas obtida em 1998/99, as quantidades de nutrientes seriam de: 36 mil t de nitrogênio; 2,9 mil t de fósforo; 77,4 mil de t de potássio; 8,7 mil t de cálcio; 2,5 mil t de magnésio e 2 mil t de enxofre. Na produção de solúvel em 1998, o conteúdo de nitrogênio presente na borra foi de 120 mil t; 56 mil t de cálcio e 37 mil t de magnésio.

Ração para animais: a presença de cafeína e taninos nas cascas requer ensilagem prévia ou peletização, podendo ser fornecida desde que não ultrapasse 20% no total de ração pois o gosto amargo afeta a palatabilidade, além do elevado teor de lignina. A utilização fica limitada às regiões produtoras, devido aos custos de transporte. A borra apresenta baixa capacidade

nutricional e elevado teor de lignina, o que também restringe essa utilização (CLAUDE, 1979; TANGO, 1971; ADAMS & DOUGAN, 1987; NAZÁRIO et al 1984; CRUZ, 1983).

Os resíduos ainda podem ter usos alternativos que em alguns casos encontram-se em fase experimental. Assim, tem-se:

Meio de Cultura e Pectina: a partir da mucilagem da polpa do café é possível cultivar fungos e leveduras comestíveis. O teor de pectina na mucilagem compara-se ao dos citrus, tradicional matéria-prima na obtenção industrial desse produto para fins alimentares e farmacêuticos (ADAMS & DOUGAN, 1987; CLAUDE, 1979).

Aguardente e álcool anidro: é possível obter-se aguardente dentro de padrões comerciais a partir da casca de café cereja na proporção de 3,2 litros para cada 765 litros de café cereja ou 2,1 litros por saca beneficiada. Na obtenção de 1 litro de álcool são consumidos 3 litros de aguardente. Com o álcool prepara-se licores e perfumes. Esses rendimentos podem ser significativamente melhorados caso a casca de café cereja passe por etapa prévia de prensagem (COSTE, 1969; SANTINATO et al, 1981; CALLE, 1951).

Gás metano: a colocação em biodigestor de mistura de 30 kg de polpa parcialmente decomposta com 18 litros de água e 2 kg de esterco gera cerca de 670 litros de gás. O gás metano pode ter diversas utilizações desde a movimentação de motores elétricos até o aquecimento de água (ARCILA, 1979 e CALLE, 1974)

Vinagre: o conteúdo de açúcares da polpa permite sua utilização em fermentações acéticas que resultam em um tipo de vinagre claro, com aroma de pêra e paladar que lembra whisky envelhecido (HAARER, 1962).

Baterias Elétricas: a polpa moída pode ser utilizada na confecção de baterias elétricas para rádios, telefones e campainhas, não se dispondo de maiores informações sobre as características elétricas das mesmas (CALLE, 1973)..

Papel: a mistura de papel branco reciclado com cascas e borra de café (como corante) permite a obtenção de um tipo de papel para fins mais nobres (agendas, cartões, papéis especiais para presentes, etc...) (COSTA RICA, 1999).

Óleo essencial: Obtido a partir do café beneficiado, o óleo pode ser utilizado como veículo aromatizante, desde que o produto seja estabilizado e protegido da oxidação, por técnicas como a microencapsulação (CALLE, 1960 e VARGAS et al., 1996).

4 – CONCLUSÃO

A gama de possibilidades de utilização dos subprodutos e resíduos do café é elevada. Muitos dos usos ainda não passaram da fase experimental. Os usos mais comuns têm sido como adubo orgânico e combustível. Usos pouco comuns requerem maior desenvolvimento tecnológico mas, eventualmente, poderão apresentar-se como excelentes opções de rentabilidade. A baixa densidade econômica dos subprodutos mais expressivos limita o aproveitamento às regiões mais próximas das zonas produtoras de café. Não se dispõe de avaliação quantitativa do uso desses materiais no Brasil.

5 - BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. R. & DOUGAN, J. Waste products. In: Clarke, Ronald J. & MACRAE, R. (ed.). **Coffee: tecnology**. London, Elsevier, 1987. v.2, p.257-81.

ARCILA O., F. Producción de biogás a base de pulpa de café. In: REUNION Internacional sobre la utilización integral de los subproductos de café, 2. Guatemala, diciembre 3-5, 1979. Chinchiná, Colômbia, Cenicafé, 1979. 17p.

BARCELOS, Adauto F. et al. Aproveitamento da casca de café a alimentação de novilhos confinados. **Circular Técnica**, Lavras (25):1-3,dez.1992.

CALLE V., H. Aceites del café. **Cenicafé**, Colômbia, 11(9):251-58, 1960.

CALLE V., N. Baterías eléctricas com pulpa y mucílago de café. **Avances Técnicos Cenicafé**, Colômbia, nº 25, 1973. 4 p.

CALLE, V. Como producir gas combustible com pulpa de café. Boletin Técnico Cenicafé, Colômbia, nº 37, 1974. 11 p.

CALLE, V. Producción de alcohol com los desperdícios del café. **Cenicafé**, Colômbia, 2(22):33-34, 1951.

CLAUDE, B. Étude bibliographique: utilization des sous-produits du café. **Café Cacao Thé**, Paris, 23(2):146-152, avril-juin 1979.

COSTA Rica Natural Paper Company. 1999. http://www.costaricanatural.com

COSTE, René. El Café. Ed. Blume, Barcelona, **Coleccion Agricultura Tropical**, 1969. 285p.

CRUZ, Geraldo M. Resíduos de culturas e indústria. **Informe Agropecuário**, Belso Horizonte, 9(108):32-37,dez.1983.

DALLA ROSA, M. et al. Coffee processing: chemical, physical and technological aspects. **Industrie delle Bevande**, Italia, **11**(59):174-178. 1982.

HAARER, A. E. **Modern coffee production** London, Leonard Hills, 1962. 405p.

INTERNATIONAL CO-OPERATIVE INFORMATION CENTRE. Chapter IV – Protecting and Conserving Natural Resorces. **http://www.wisc.edu**

MALAVOLTA, E & COURY, T. Adubação do Cafeeiro. In: Graner, E.A.& Godoy Junior, C. (coord.). **Manual do Cafeicultor**. São Paulo, 1967. Cap.VII, p.153-196.

MUZILLI, Osmar. Eficiência agronômica da borra de café solúvel para aplicação em cultura de ciclo anual. Londrina, **Informe de Pesquisa**, ano VI, n.43, jun .1982. 5p.

NAZÁRIO, Walter; GOMES, L.C; & RETZ, Luciana. Intoxicação em bovinos pela palha de café utilizada como cama. In: **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, SP, 6(6):192-195, nov./dez.1984.

NOGUEIRA, Luíz A. H. & FLORES, Luíz F. V. Potencialidade energética da borra de café para as indústrias de café solúvel. **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**, Itajubá, p.15-25, jan.1988.

SAFRA será de 23,15 milhões de sacas. **Jornal do Café**, São Paulo, Ano 8, nº 89, jan./1999, p.18-19.

SANTINATO, R.; MATIELLO, J.B.; SILVA & SILVA, O.A. de. Aguardente e álcool da casca de café. In: **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 9**, São Lourenço, Minas Gerais 27 a 30 de out./1981.

TANGO, João S. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos** – ITAL, Campinas (28):49-73, dez. 1971.

VARGAS Z., A. M.; SÁNCHEZ H., A. F.; CASTAÑO C., J. J. Microencapsulación de aceite de café. **Cenicafé**, Colômbia, 47(1):32-41, 1996.

VEGRO, Celso L. R. & CARVALHO, Flavio C. de. Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. **Informações Econômicas**, IEA, SP, **24**(1):9-16. 1994.

EVALUACION DE LA MADUREZ DE LA COMPOSTA DE PULPA DE CAFE

Gloria Sánchez, Eugenia J. Olguín, Ricarda Marín y Gabriel Mercado.

Departamento de Biotecnología Ambiental. Instituto de Ecología, A.C. - Km 2.5 ant.carr. a Coatepec. Xalapa,Ver. 91000. México. Fax: (28) 18 78 09. E-mail:glorias@ecologia.edu.mx

INTRODUCCION

Desde hace aproximadamente 10 años, el Departamento de Biotecnología Ambiental, ha venido desarrollando tecnologías que permitan disminuir los impactos ambientales ocasionados por las descargas de aguas residuales y por los residuos sólidos orgánicos de la agroindustria cafetalera. Dichas tecnologías están basadas en la aplicación de procesos y acciones congruentes con los principios de producción más limpia, como lo es la minimización y reciclaje de residuos a través de opciones biotecnológicas tales como el compostaje. La tecnología desarrollada para el compostaje acelerado de la pulpa de café, es sencilla, rápida y eficaz, la cual ya ha sido transferida a beneficios ubicados en la región de Huatusco, Ver. México. Esta consiste en acelerar el tiempo de estabilización de la pulpa de café, adicionando otros residuos ricos (cachaza y gallinaza) en compuestos fácilmente disponibles, los cuales permiten acelerar el proceso de degradación, además de mejorar la calidad final de la composta en términos de N (4.5%) y P (3%)(Sánchez y col., 1999).

Un aspecto importante dentro de la calidad de la composta, es su grado de madurez, ya que sólo compostas maduras pueden ser adicionadas al suelo, sin causar daño a suelos y plantas. El uso de composta madura influye positivamente en cultivos debido a la habilidad para abastecerlos de nutrientes, además de que ha sido demostrado que su aplicación mejora la porosidad y capacidad de retención de agua, la capacidad amortiguadora del suelo e incrementa el porcentaje de materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico (Iglesias y Pérez, 1991).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la madurez de la composta obtenida durante el compostaje acelerado de pulpa de café con y sin aceleradores orgánicos.

MATERIALES Y METODOS

Se montaron pilas de forma cónica con un volumen de $2m^3$, en las instalaciones del beneficio de café de la Fam. Marini en Huatusco,Ver. Dichas pilas tenían la siguiente composición: Pila 1: 100% pulpa de café, Pila 2: 20% cachaza y 12% gallinaza y Pila 3: 26% cachaza y 10% gallinaza. Los aceleradores fueron obtenidos sin costo en las cercanías del beneficio. La aireación se llevó a cabo una vez por semana a través de volteo manual. Las muestras fueron colectadas periódicamente coincidiendo con el volteo de las pilas. Los días de muestreo fueron: 0,5,19,33,46,60,74 y 88 (fase biooxidativa) y 102,123,137,165 y 207 (fase de madurez). Cada muestra fue de aproximadamente 3 kg con una réplica. Los parámetros a determinar fueron: temperatura, capacidad de intercambio catiónico (de acuerdo a Harada e Inoko 1980a), y sustancias húmicas (extracción de acuerdo a Bernal y col., 1996) tales como: relación Carbono de ácidos húmicos/Carbono de ácidos fúlvicos (Cah/Caf), índice de humificación (IH)=(Carbono de ácidos húmicos/Carbono oxidable x 100), contenido de ácidos húmicos (determinación de acuerdo a Iglesias y Pérez, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSION

Fig.1 muestra el perfil obtenido de la temperatura.La fase mesófila (abajo de los 40^0 C) duró sólo unas horas, ya que la temperatura se incrementó rápidamente con la primera aireación y en el día 1 ya se había establecido la fase termófila (arriba de los 40^0 C). Esta fase fue significativamente más larga en las pilas con aceleradores (37 días) que en las que solo tenían pulpa (25.5 días). Asimismo, las pilas con aceleradores permanecieron más tiempo en el período óptimo de descomposición de la materia orgánica (52-60^0 C), lo cual pudo deberse a la aportación de carbono y nitrógeno fácilmente disponible presentes en la cachaza y la gallinaza, además de la gran cantidad de microorganismos muy activos contenidos en la gallinaza.Los resultados anteriores, son semejantes a los reportados en trabajos anteriores (Sánchez y col., 1999). La fase bio-oxidativa duró aproximadamente 88 días, es decir cuando se alcanzó la temperatura ambiente. Posteriormente, se inició la fase de madurez, la cual es caracterizada por llevarse a cabo a temperatura ambiente. Durante este período, se continúa con la degradación parcial de la materia orgánica, transformándola en compuestos más resistentes a la biodegradación, por lo que el proceso se monitoreó hasta el día 207.

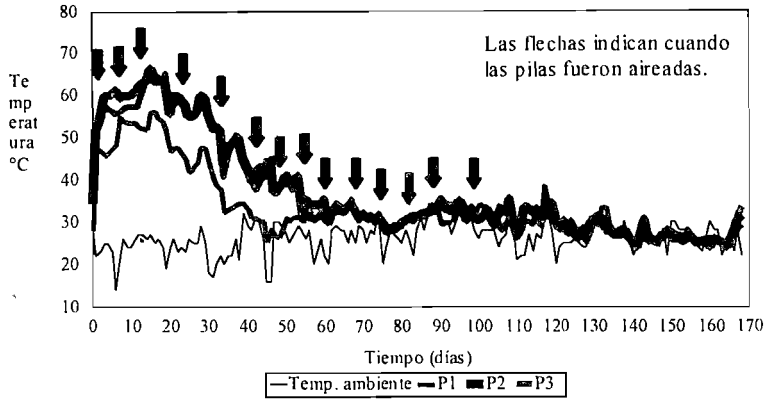


Figura 1. Perfil de temperatura durante el compostaje de pulpa de café con y sin aceleradores.

Tabla 1. Evolución de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) durante el compostaje de pulpa de café con y sin aceleradores (meq/100 g).

Día	P1	P2	P3
0	87.94	65.70	79.59
5	74.79	68.13	80.96
33	86.76	90.04	82.34
60	86.27	93.77	84.05
88	86.50	97.34	94.23
102	86.05	5.82	93.30
123	90.04	93.21	91.56
137	87.36	96.17	86.99
165	86.21	95.65	90.18
207	88.87	99.51	88.80

En la Tabla 1, se observa la evolución de la capacidad de intercambio catiónico (CIC), parámetro que ha sido utilizado para evaluar el grado de humificación del suelo, ya que un incremento en éste es una de las principales consecuencias del proceso de madurez del material orgánico (Levi-Minzi y col., 1986). Durante la fase bio-oxidativa, la CIC de la pulpa sola no presentó cambios importantes y en los días 33, 60 y 88 los valores fueron muy similares, terminando con un valor parecido al inicial (88.87 meq/100g). Por el contrario, cuando los aceleradores fueron adicionados, se observó un incremento gradual en la capacidad de intercambio catiónico durante la fase de mineralización de la materia orgánica. Este incremento fue considerable sobre todo en las pilas que tenían mayor contenido de gallinaza (P2) (48.15%). En la fase de madurez, los valores de P2 fueron inconstantes, sin embargo al final del proceso (día 207) se registró el valor más alto para la CIC en estas pilas (99.51 meq/100g). El comportamiento presentado por P3 fue diferente al de P2, ya que se registró un ligero decremento del día 88 al 207. El incremento de la CIC a lo largo del proceso en las pilas con aceleradores fue significativamente mayor que en la pulpa sola. Lo anterior podría significar que los aceleradores estarían aportando precursores de moléculas con mayor polimerización que las encontradas en la pulpa sola y produciendo una mayor cantidad de grupos funcionales como los carboxílicos.

Tabla 2. Cambios en los parámetros de humificación durante el compostaje de pulpa de café con y sin aceleradores.

Día	P1		P2		P3	
	Cah/Caf	IH	Cah/Caf	IH	Cah/Caf	IH
0	1.95	16.62	1.84	15.31	2.06	20.76
5	1.70	16.13	1.91	17.18	1.88	28.70
19	1.81	18.88	1.92	17.06	2.77	18.53
33	2.84	19.24	3.51	21.99	3.63	23.53
46	2.72	20.40	4.18	27.03	4.05	26.58
60	2.55	20.80	2.90	21.86	3.62	23.63
74	2.74	21.09	3.95	25.78	2.83	18.47
88	2.15	21.10	2.58	22.86	2.49	22.83
102	2.05	12.53	2.94	20.89	2.92	13.79
123	1.90	17.03	2.02	21.85	2.91	21.33
137	1.98	12.84	3.20	21.70	3.22	20.03
165	2.04	15.92	3.32	22.93	3.44	22.20
207	1.96	15.00	3.96	23.59	3.70	21.45

Dichos resultados, concuerdan con lo encontrado en los parámetros de humificación, ya que como se observa en la Tabla 2, la relación Carbono de ácidos húmicos/Carbono de ácidos fúlvicos (Cah/Caf) y el índice de humificación (IH) también se incrementaron a lo largo del proceso sobre todo en P2 y P3. La relación Cah/Caf puede ser considerada como un parámetro válido para establecer el grado de madurez de la composta ya que un incremento en ésta, indica que la materia orgánica está en un proceso de humificación (Bernal y col., 1996). Durante la fase bio-oxidativa, se observó que en P1 dicha relación se incrementó ligeramente alcanzando un valor de 2.05. Sin embargo en la fase de madurez retomó un valor similar al del día 0, finalizando con un valor de 1.96. Las pilas con aceleradores mostraron un incremento tanto en la fase bio-oxidativa, como en la fase de madurez. P2 inició con un valor de 1.84 (día 0) y finalizó con un valor de 3.96 (día 207) y P3 inició en 2.06 y terminó en 3.70. Los resultados obtenidos en las pilas con aceleradores están de acuerdo con lo reportado por
otros autores, para el compostaje de desechos municipales (Iglesias y Pérez , 1992) y de bagazo de sorgo dulce con excretas de animales (Bernal y col., 1996). Ellos encontraron un incremento gradual en esta relación, de valores menores de 1 hasta valores mayores de 3. Asimismo, el aumento en dicha relación pudo haber sido el resultado de la degradación de la fracción fúlvica y un incremento gradual en la velocidad de polimerización progresiva de compuestos orgánicos ocurrida durante el compostaje.

Finalmente, uno de los parámetros más importantes para evaluar el grado de madurez de una composta es el IH, ya que éste representa la fracción de ácidos húmicos en relación al carbono presente en la muestra (Bernal y col., 1996). Durante los primeros 46 días se observó un incremento en este parámetro en todas las pilas (Tabla 2), especialmente en las que contenían los aceleradores que alcanzaron valores máximos de 27.03% y 26.58% contra 20.40% de la pulpa sola. Durante los siguientes días, se observó un comportamiento ligeramente irregular en las pilas con aceleradores. Durante la fase de madurez, el comportamiento del IH se tornó más regular. Sin embargo, posteriormente se registraron incrementos en las pilas con aceleradores principalmente en P2, a diferencia de la pulpa sola, en la cual se observó un decremento, lo que puede indicar que la pila con mayor contenido de gallinaza tuvo una mejor humificación que la pulpa sola. Los valores finales del IH de las pilas con aceleradores, fueron significativamente mayores (23.56% y 21.45%) en comparación al de la pulpa sola (15%).

Cah/Caf=relación carbono de ácidos húmicos/carbono de ácidos fúlvicos IH= índice de humificación

Los ácidos húmicos son la fracción más importante dentro de las sustancias húmicas e indican el grado de humificación y madurez de la composta (Chefetz y col., 1996). Al inicio del proceso, el porcentaje de

dichos ácidos en la pulpa sola y en las pilas con aceleradores fueron muy similares (66 y 64%). Conforme avanzó el proceso, las pilas con cachaza y gallinaza tuvieron un comportamiento muy similar en el contenido de ácidos húmicos, mostrando valores de alrededor de 80.68 al día 46. En la fase de madurez, la pulpa sola no presentó cambios en el contenido de ácidos húmicos finalizando con un valor similar al inicial (66.31%). En las pilas con aceleradores, se observó un comportamiento más o menos constante, finalizando con porcentajes de 79.83% para P2 y 78.25% para P3. El porcentaje de ácidos húmicos fue significativamente mayor en las pilas con aceleradores que en la pulpa sola. Los cambios en los porcentajes de ácidos húmicos en las pilas con aceleradores, tuvieron un comportamiento similar a lo reportado por Chefetz y col. (1996), quienes mencionan que durante el compostaje, los ácidos húmicos llegan a ser la fracción principal dentro de las sustancias húmicas. El aumento en C_{ah}/C_{af}, en el IH y en el contenido de ácidos húmicos en las pilas conteniendo los aceleradores, sugiere que la gallinaza y la cachaza aportan precursores de moléculas que presentan una mayor polimerización que las de la pulpa sola.

CONCLUSIONES

La adición de los aceleradores promovió la obtención de compostas con un mayor grado de madurez que las obtenidas con pulpa sola, lo que le da un mayor valor agronómico a la composta obtenida con esta tecnología. Por otro lado, es importante mencionar, que los trabajos realizados por los autores y la vinculación con los productores han permitido llevar a cabo la creación de la Asociación "Pro-Beneficio Limpio", integrada por beneficiadores de la región de Zentla, Ver. (México) y en la cual destaca la implementación de un Programa que permita la aplicación de procesos y acciones acordes a los principios de producción más limpia en el agroecosistema cafetalero, contando para ello con la asesoría del Departamento de Biotecnología Ambiental del Instituto de Ecología, A.C. y del Centro Internacional de Tecnologías Más Limpias y Desarrollo Sustentable, CITELDES,A.C.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Sistema de Investigación del Golfo de México (SIGOLFO)dependiente del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México.

REFERENCIAS

Bernal, M.P., Navarro, F.A., Roig, A., Cegarra, J. and García, D., 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biol. Fertil. Soils*, **22**:141-148.

Chefetz, B., Hatcher, P. G., Hadar, Y. and Chen, Yona. 1996. Chemical and Biological Characterization of Organic Matter during Composting of Municipal Solid Waste. *J. Environ. Qual.*, **25**:776-785.

Harada, Y., and Inoko, A., 1980a. The Measurement of the Cation-Exchange Capacity of Composts for the Estimation of the Degree of Maturity. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**:127-134.

Iglesias, E. and Pérez García, V., 1991. Composting of domestic refuse and sewage sludge. I.Evolution of temperature, pH, C/N ratio and cation-exchange capacity. *Resour. Conserv. Recy*, **6**:45-60.

Iglesias,E. and Pérez,V.1992. Determination of Maturity Indeces for City Refuse Composts. Agr Ecosyst Environ., **38**:331-343.

Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., and Saviozzi, A., 1986. Organic Matter and Nutrients in Fresh and Mature Farmyard Manure. *Agricultural Wastes*, **16**:225-236.

Sánchez,G., Olguín,E.J. and Mercado,G. 1999. Accelerated coffee pulp composting. *Biodegradation*, **10**(1):35-41.

CAFFEINE DEGRADATION IN FRESH AND ENSILED COFFEE PULP BY SOLID STATE FERMENTATION: INFLUENCE OF SUBSTRATE PRETREATMENT AND INOCULUM LEVEL

Romano-Machado J.[1],Gutiérrez-Sánchez G.[1], Perraud-Gaime I.[2], Gutiérrez-Rojas M.[1] Y Saucedo-Castañeda G.[1*]

[1]Autonomous Metropolitan University, Ave. Michoacán Y La Purísima, Iztapalapa, 09340, México D.F.
Fax: (55) 57 24 47 12, E-Mail: Saucedo@Xanum.Uam.Mx
[2]Institut De Recherche Pour Le Développment (Ird-México), Cicerón 609, Los Morales, 11530, México D.F.

SUMMARY

Caffeine degradation in fresh (FP) and ensiled (EP) Coffee Pulp (CP) using Solid State Fermentation (SSF) was studied. Thermal treatment and different inoculum levels were also tested in a SSF process. With SSF a 95 % in EP and 55 % in FP of caffeine degradation was reached using a Penicillium comune (V33A25) strain after ten days of fermentation without thermal treatment. Presence of enzymatic activities like tannase (tannin-acyl hydrolase) and exopectinase shown the capacity of strain to utilize tannins and pectins constituents of CP. Initial massive inoculation of 10^{-} spores/ g moist substrate only 56 % of caffeine was degraded in four days of SSF. Nevertheless the diminishing in natural microflora of CP due to thermal treatment produced a significative increase in degradation up to 94 % for EP and 100 % for FP in four days of fermentation. Preservation trough silage and the combination of proper thermal treatment and the use of selected strains can reduce contents of antinutritional and antiphysiological compounds in CP establishing its application potential in animal feed.

RESUMEN

Se estudió la degradación de cafeína en Pulpa de Café (PC) fresca (PF) y ensilada (PE) utilizando la Fermentación en Medio Sólido (FMS). Se probó el tratamiento térmico y diferentes niveles de inóculo en FMS. Por este método de fermentación fue posible degradar 95 % de la cafeína en PE y 55 % usando PF con la cepa de Penicillium comune (V33A25) sin un tratamiento térmico previo y después de 10 días de incubación. Además la presencia de actividades enzimáticas tanasa (tanin-acil hidrolasa) y exopectinasa mostró que el hongo es capaz de utilizar además pectinas y taninos presentes en la PC. La inoculación masiva inicial permitió degradar 56% de la cafeína, en 4 días de FMS, con un nivel de inoculo de 10^{-} esporas/g de sustrato húmedo. Por otra parte el tratamiento térmico disminuyó significativamente la microflora nativa lo que evitó contaminaciones en la FMS y permitió aumentar significativamente la degradación a 100 % en PF y 94 % en PE en 4 días de fermentación. La conservación por ensilaje y la combinación de un tratamiento térmico adecuado y el uso de microorganismos seleccionados permite reducir el contenido de compuestos antifisiológicos y antinutricionales en la PC estableciendo su potencial de aplicación en la alimentación animal.

INTRODUCTION

Coffee Pulp (CP) is an agroindustrial waste obtained from coffee fruits benefaction process and represent 40 % of the whole fruit mass (Zuluaga, 1989). CP represents a serious pollution problem in tropical areas taking to account the large volumes of grain produced each season (Aquiahualt *et al.*, 1988; Rosussos *et al.*, 1995). Conservation and utilization of CP has been difficult due to, among other factors, its scatter and seasonal production, high moist content (80-85 %), presence of nutrient factors (carbohydrates, proteins and minerals) which facilitates its destruction for a wide variety of microorganisms. Alternatives proposed for the utilization of CP include its use as animal food, organic compost, substrate for enzyme production, biogas, mushrooms, vermiculture (Gaime-Perraud *et al.*, 1993). Nevertheless its utilization as animal food is limited by the presence of antiphysiological and antinutritional compounds as caffeine (1,3,7-trimethylxantine), tannins and polyphenols (Roussos *et al.*, 1995). Porres *et al.* in 1993 found reduction in caffeine contents up to 63 % in 223 days of silage for conservation of 3 t of CP supplemented with cane molasses. More recent studies for conservation of CP followed by SSF for reduction of caffeine content shown that in anaerobic fermentation with lactic acid bacteria inocula during silage of dried CP did not reduce caffeine content but permit conservation of the ensiled CP (Gaime-Perraud, 1995). SSF studies for caffeine reduction developed include isolation and screening of fungi strains able to degrade caffeine in dried fresh CP and complete degradation of caffeine in 45 h of fermentation with highly degrading strains

(Aquiahualt *et al.*, 1988; Rosussos *et al.*, 1995). Experiments with EP shown significative caffeine reductions in longer fermentation times (48 to 120 h) due to a retard in germination of spores from inoculum caused by the presence of organic acids produced during silage (Gaime-Perraud, 1995).
One strategy proposed for valorization of CP is conservation of large volumes of CP produced during crop season trough silage then use SSF for detoxification of EP and improve its potential of use in animal feed. In present work caffeine degradation in fresh and ensiled CP was analyzed. Thermal treatment and inoculum level were tested as strategies for improve caffeine degradation and standardization of SSF conditions for scale-up the process.

METHODOLOGY

Strain source

A *Penicillium comune* strain (V33A25) isolated from the CP and belonging to the IRD-UAM collection was used. It was considered because of its high efficiency of caffeine degradation reported previously (Aquiahuatl *et al.*, 1988; Roussos *et al.*, 1995; Gaime-Perraud, 1995; Hakil *et al.*, 1998).

Solid fermentation substrates preparation

The fresh coffee pulp (PF) samples were obtained from a coffee processing plant in Jalapa, Veracruz state, Mexico during the 1997-1998 coffee season (September 97 - March 98). Samples were frozen at -20°C until their utilization. A batch of 400 kg of PF was inoculated with a lactic acid bacterium strain, isolated from the ensiled pulp by Gaime-Perraud in 1995 and named as B01. Inoculation level was $2.6\text{-}5.2 \times 10^7$ cellg^{-1} wet basis corresponding to 5 % (v:w). Material was ensiled, in 20 kg plastic containers for its conservation and stored until utilization. Lixiviates from 9 containers were taken for enzymatic determination of dextrose (D+glucose) and L-lactic acid by using a YSI instrument. A 10 cm thick samples of 1 kg of FP and EP were treated in an autoclave at atmospheric pressure (95°C) for 1 hour using a direct steam stream. Samples were taken to analyze UFC and moisture content, after treatment samples were dried at ambient temperature during 24 hour. Samples from the same batch without thermal treatment were used as controls for SSF.

Inoculum development and SSF conditions

Strain was 4 times subculture on CSM (Aquiahuatl *et al.*, 1988): commercial coffee used was Grand'Mére "familial"^{MR}, infusion of 40 gl^{-1} was filtered by Whatman paper No. 41, then salts and agar were incorporated in following concentrations (gl^{-1}): sucrose 2.0; KH_2PO_4 1.3; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.12; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.3; agar 20.0. pH was adjusted to 5.6 using KOH, 0.1 M and the volume was adjusted to 1 liter. The culture medium was sterilized at 121°C for 15 minutes. Cultures were grown at 30°C for 7 days using Erlenmeyer flask or Rusk bottles inoculated with 10^6 spores cm^{-3} The spores were harvest with Tween 80 solution (1 %) and magnetic stirring for 20 minutes. They were centrifuged to reach concentrations of 10^4,10^5,10^6,10^7 and 10^8 spores g^{-1} wet solid. SSF was achieved according to the methodology described by Raimbault and Alazard in 1980, using cylindrical glass laboratory reactor incubated at 30°C and with humid saturated air flow of 0.5 vkgm (dm^3 of air g^{-1} of medium min^{-1}). Samples in duplicate were taken for analytical determinations.

Humidity determination, pH and samples treatment.

Humidity of solid samples was determined by gravimetry. Wet solid samples were milled and resuspended in water in 1:10 (w/w) ratio and pH was determined with a Conductronic pH 20 potentiometer previously calibrated. The supernatant were recovered by centrifugation at 5000 rpm for 20 minutes and stored at -20°C until their analysis.

Volatile fatty acids (VFA) determination

The volatile fatty acids (VFA) concentration, glucose and fructose were determined by HPLC using a Rezek Organic Acid column and H_2SO_4 30 mM as mobile phase at 0.6 cm^3min^{-1} flow rate. Analyses were carried out at 50°C using a refraction index detector. A flame ionization detector (FID) gas chromatograph was also used for VFA analysis.

Caffeine and metabolic intermediaries analysis

Dried and milled (mesh 35) solid samples were extracted with a chloroform/isopropanol mixture (50:50, v/v) doing three successive extractions. Solvent was evaporated by heating and the extract was resuspended in equivalent Milli-Q water volume. Caffeine and intermediary molecules was analyzed by HPLC, using a modification of the technique reported by Denis, 1996: Spherisorb ODS-2 column, acetonitrile/tetrahydrofurane/deionized water (5:1:94 v/v/v), 1.5 cm^3 min^{-1} flow rate, room temperature, diodes array detector at λ=273 nm were used.

CO_2 determination by gas chromatography
Gow-Mac 580 chromatograph was used, equipped with a Alltech (CTR1) concentric column and a thermal conductivity detector (TCD) as previously reported (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994).

Enzymatic activities
Tannase (tannin-acyl hidrolase) activity was achieved using the technique reported by Beverini and Metche, 1990. It is based on the galic acid liberation which is determined by HPLC at λ=280 nm. Results were expressed as mM cm^{-3} min^{-1} of galic acid released at the reaction conditions. Exopectinase activity was determined modifying the technique described by Schwan and Rose, 1994. Based in the galacturonic acid liberation from the pectin hydrolysis. Results were expressed as mM cm^{-3} min^{-1} of galacturonic acid released at reaction conditions. Proteolytic activity was determined using Azocoll as substrate according as described previously by Bidochka and Khachatourians, 1987. A proteolytic unity was defined as the enzyme require to increase 0.001 optical density units at λ =580 nm, at reaction conditions.

Microorganisms counting
Cultivation was done following the methodology described by Perraud-Gaime in 1995, using Petri dishes. Standard nutritional agar (Bioxon) was used for total microorganisms and PDA (Bioxon) added with antibiotic for plating fungi and yeast. Plate count was done after 24 hours of incubation at 30°C. Results were expressed as UFC g^{-1} dry matter.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Characterization of inoculated coffee pulp silage using a homolactic bacteria
The aim of this trial was to set up the methodology for in silage inoculation in coffee benefaction plants. A total quantity of 400 kg of coffee pulp, wet basis, was ensiled using a homolactic LAB strain B01. Requiring nearly 20 l of lactic acid bacteria culture. Liquid medium was prepared using a diluted MRS broth (25%) for all the nutrients exception made of glucose concentration. Results of glucose uptake and lactic acid formation are shown in Figure 1. Glucose was consumed almost completely in first four days of silage. Concentration of L-lactic acid in lixiviates increased up to 7.4 g l^{-1} in 11 days of silage, then no further accumulation was observed. A high microbial activity was observed through the liberation of a large quantity of CO_2 which was not measured. This fact caused difficulties for control of anaerobiosis in the silages.

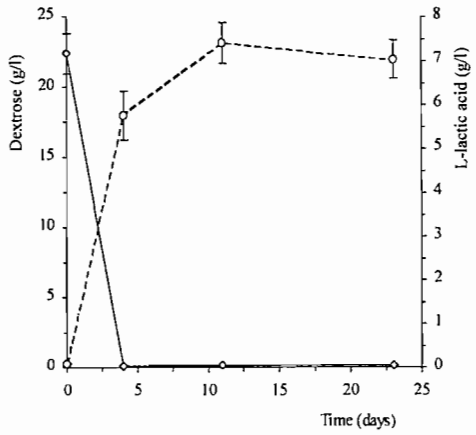


Figure 1. Glucose uptake (-◊-) and lactic acid formation (••O••) during coffee pulp silage inoculated with LAB strain B01.

Caffeine degradation in FP and EP
Experiences of SSF were done using FP and EP as potential available substrates coming from areas of pulping processing plants of coffee cherries. Fermentations were run until the apparition of green-blue color characteristic of *Penicillium* genus spores. Inoculum size was fixed at initial concentration of 10^7 spores g^{-1} moist solids.
Figure 2 shows kinetics of caffeine degradation in SSF using both substrates. Degradation was higher by using EP rather than FP, where degradation of caffeine was 96 and 66 % after 10 days of fermentation. In this case, the duration of the culture required for obtain a significative reduction of caffeine content in EP was greater than in previous works with sun dried CP. Aquiahualt *et al.* in 1988 found that 40 h of culture are required for complete degradation of caffeine in FP, using a *Penicillium roquefortii* strain isolated from CP. In more recent studies the duration of cultivation required for complete caffeine depletion ranged between 48 and 120 hours depending on the source of lactic acid bacteria used for CP silage (Gaime-Perraud, 995).Bacterial contaminants appearing during the culture were the most probable cause for the long term of the SSF process. The origin of the contamination was the natural microflora of FP and EP, on the other hand, this natural microflora was seriously diminished when using CP sun dried was . used avoiding problems of contamination (Aquiahualt *et al.*, 1988; Gaime-Perraud, 1995).

Initial moisture contents of FP and EP were 80.5 and 84 % respectively and were slightly raising during the process up to a final value of 86 and 990%, respectively (data not shown). These excess of moisture produced liquid running out from solid bed during fermentation and given an undesirable conditions for developing of the culture in solid media.

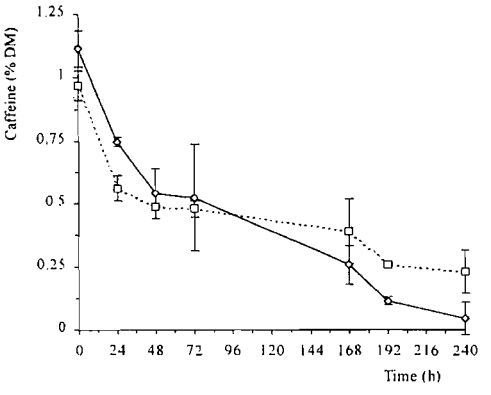


Figure 2. Kinetics of caffeine degradation in ensiled (-◊-) and fresh (•• ••) coffee pulp during solid state fermentation with *P. comune*.

Initial pH in FP and EP were 4.8 and 3.7, respectively (Fig 3a). Decreased of pH in the first hours of culture in FP can be explained by the acetic acid production (data not shown). The pH of culture in EP increased rapidly as a result of VFA consumption produced during previous silage of CP (Fig 3b). Organic acids detected were: lactic, acetic and propionic at initial ratios of 1:1.7:0.25, in any case butyric acid was found. Organic acids were consumed during the first 72 h of fermentation. Increased in pH from 168 h of fermentation was probably the result of the released of urea due to complete caffeine degradation.

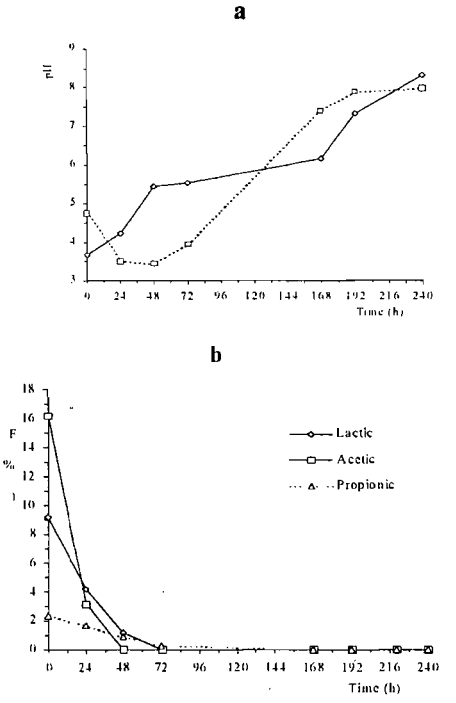


Figure 3. Kinetics of pH evolution in coffee pulp ensiled (-◊-) and fresh (••••) (a) and volatile fatty acids composition in PE (b) during solid state fermentation with *P. comune*.

Metabolic activity of *P. comune* during SSF was monitored through CO_2 evolution in fermentation using both substrates PE y PF (Figure 4). Maximum velocity of carbon dioxide production in EP (11.52 mg g^{-1}IDM h^{-1}) was obtained at 22 h of culture since in FP was the half (5.66 mg g^{-1}IDM h^{-1}) and was reached later (44 h). Decreased of metabolic activity in FP could be associated with the presence of a higher charge of contaminants, as indicated above. This situation changed in EP because the production of organic acids during silage probably reduced the microbial population (Gaime-Perraud, 1995). In the case of EP a lag phase of 12 h was observed as a result of inhibition of spore germination probably produced by organic acids content of EP.

Figure 5a and b show preliminary results obtained in enzymatic activity determinations of tannase and exopectinase during the course of fermentations of EP and FP with the *P. comune* strain used. Expression of these enzymatic activities revealed that this mold is able to utilize other nutrients presents in CP rather than caffeine, like tannins and pectic substances.

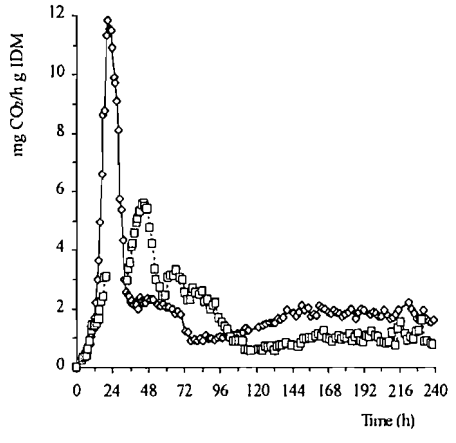


Figure 4. Kinetic of CO_2 evolution rate in coffee pulp ensiled (-◊-) and fresh (••••) during solid state fermentation with *P. comune*.

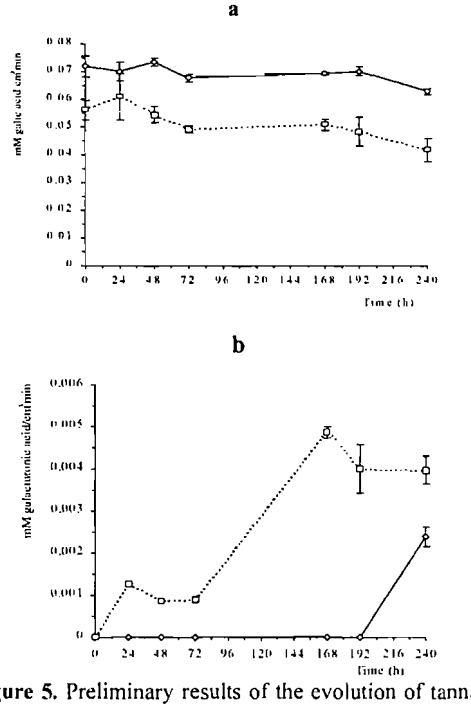


Figure 5. Preliminary results of the evolution of tannase (a) and exopectinase (b) enzymatic activities in ensiled (-◊-) and fresh (•• ••) coffee pulp during solid state fermentation with *P. comune*.

At the moment fermentations experiences are performed for modification of enzymatic analysis according to the characteristics of enzymatic extracts obtained from SSF with CP. More studies are required in order to set up the methodology of production of enzymes using natural substrates as raw and ensiled coffee pulp.

Results presented in this section show a long process for caffeine degradation using EP and FP as substrates of SSF, probably due to bacterial contaminations appeared in both substrates. Although these contaminants are present in less extent in EP its effects are also negatives. This information led to realize studies of thermal treatment of the CP before its utilization as substrate in SSF.

Effect of thermal treatment of substrate: FP y EP

As can be see in Figure 6 initial content of total microorganisms is very high (10^{10} CFU g^{-1} DM), it is twice higher in FP that in EP. During thermal treatment of the EP and the FP a significative reduction of the microbial content was observed after 20 min of exposition to direct steam stream in both substrates. It allowed to reduce natural microflora of CP in a short time treatment and standardize initial conditions for SSF. For later studies, a thermal treatment was used as previously to the fermentation process in further experiences.

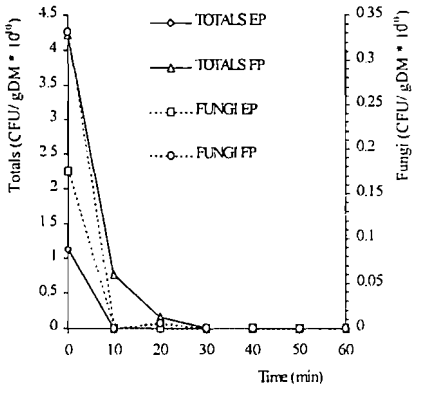


Figure 6. Reduction of microflore present in ensiled (EP) and fresh (FP) coffee pulp during thermal treatment with steam stream at 95 °C.

On the other hand pasteurization process did not caused an increase of moisture content of substrates, and kept values around 80 % during the process (data not shown). However substrates still had high water content at the end of thermal treatment and it can be responsible of water and nutrients losses during SSF, as have been stated in previous paragraphs. To avoid this problem pasteurized substrates were dried at room temperature for 24 h with a reduction of moisture up to 75 % avoiding risks of running off in SSF. Conclusion of this results is the need of pasteurization with steam stream at 95 °C during 20 min and further drying at room temperature for 24 h.

Effect of inoculum level in caffeine degradation in FP and EP with and without thermal treatment.

Experiments with EP and FP with or without thermal treatment were performed in order to asses the effect of heat treatment on caffeine degradation, using different inoculation levels in SSF. Figure 7 shows results obtained after 4 days of fermentation. A significative increase in caffeine degradation of 30% (α=0.05) for EP was observed when thermal treatment and partial drying were used (Fig 7a). These results suggested the need of reduction of the initial

charge of contaminants in order to allow the growth of the mold used ant therefore caffeine degradation can occurred. In EP without thermal treatment caffeine reduction was around 65 %. Increase of inoculum concentration had a positive effect in caffeine degradation starting from a concentration of 10^5 spores g^{-1} of moist substrate. Increment of inoculum level up to 10^8 spores g^{-1} of moist substrate did not produce a significative increment in caffeine degradation. Besides only 40 % in caffeine degradation was reached when EP without thermal treatment was non inoculated, caused by the action of natural microflora. This finding confirm the proposal of inoculation of EP with thermal treatment using the *P. comune* strain which has the potential for degrading caffeine.

Thermal treatment caused a total caffeine degradation when FP was inoculated at every levels but in FP without thermal treatment the results were quite random and lower than in FP with thermal treatment (α=0.05) due to the differences in natural microflora behavior (Fig 7b). Only with a very high inoculum level of 10^8 spores g^{-1} of moist substrate in FP without thermal treatment could reach the same caffeine reduction as in EP without thermal treatment. The use of thermal treatment and inoculation of CP, FP or EP, is well stated as this point showing the necessity of standardize initial conditions of SSF for caffeine degradation in CP in large volumes.

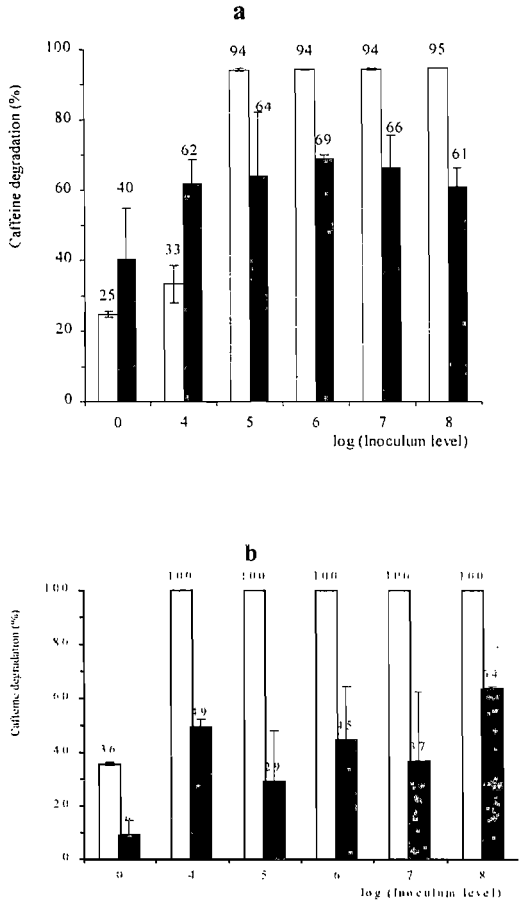


Figure 7. Caffeine degradation by *P. comune* in 4 days of solid state fermentation of ensiled (a) and fresh (b) coffee pulp with (empty bars) and without (filled bars) thermal treatment using direct steam stream at 95 °C during 20 min.

Figure 8 shows kinetic of CO_2 evolution rates during SSF of EP with (Fig 8a) and without (Fig 8b) thermal treatment. Inoculation of 10^4 spores g^{-1} moist substrate caused an increment in maximum CO_2 evolution rate when EP was previously pasteurized but further increments up to 10^8 spores g^{-1} moist substrate did not improve maximum rates (Fig 8a), similar results to that already presented were obtained for caffeine degradation in FP. A direct relationship between maximum CO_2 evolution rate and caffeine degradation could be establish at this point, taking to account that caffeine is use as nitrogen source by the fungus (Denis, 1996; Hakil, 1998; Roussos *et al.*, 1995).

In EP without thermal treatment a random behavior of maximum CO_2 evolution rate with increment of inoculum level was obtained probably because the difficulties encountered for standardize initial microbial content of solids (Fig 8b). In case of inoculum levels of 10^5 spores g^{-1} moist solid for EP without thermal treatment were found higher maximum CO_2 evolution rates (near

15 mg h^{-1} g^{-1} IDM) than in EP with thermal treatment probably because the contribution to respiration of natural microflora of EP without hermal treatment.

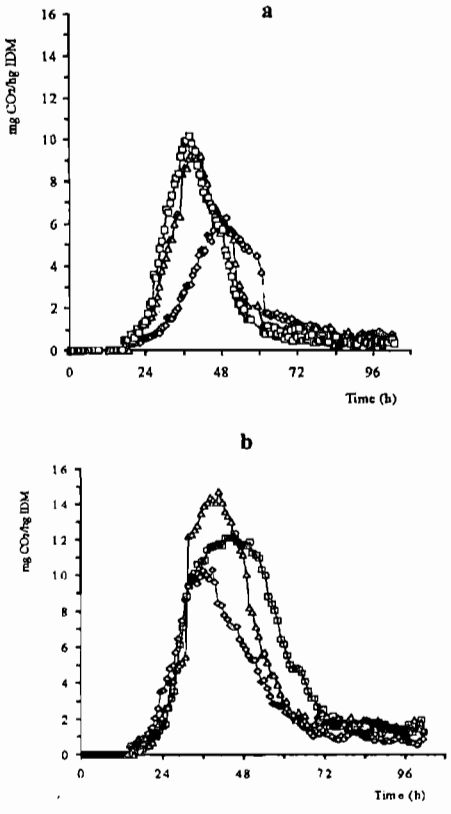


Figure 8. Kinetic of CO_2 evolution rates in 4 days of solid state fermentation of ensiled coffee pulp with (a) and without (b) thermal treatment with different inoculum levels (no inoculum -◊-, 10^5 -Δ-, 10^7 - -) of *P. comune*.hermal treatment and partial drying improved caffeine degradation.

Inoculation levels since 10^5 spores g^{-1} moist substrate increased significatively efficiency of caffeine degradation in EP but inoculum level was set at 10^6-10^7 spores g^{-1} moist substrate in further experiments. Because lesser levels facilitate development of contaminants in SSF (Soccol, 1992) and higher levels possibly cause inhibition phenomena in spores germination (Barrios *et al.*, 1989).

Results obtained show the viability of utilize SSF to reduce caffeine content of CP without alteration in substrate characteristics and with the possibility to use first silage, as a simple method of conservation, and then controlled conditions of SSF for detoxifying or production of enzymatic extracts able to be applied during silage for partial or total degradation of caffeine. A similar experimental plan could be employed for reduction of poliphenols content in coffee pulp. On the other hand these results help to face scale up of SSF for coffee pulp detoxification

CONCLUSIONS

A number of methodologies have been set up in order to carried out microbiological and biochemical analysis in fermented and raw substrates. In the same sense, the methodology of inoculation of coffee pulp using lactic acid bacteria had been tested, resulting in an useful experience for future studies.

Strain of *Penicillium* V33A25, identified as *Penicillium comune* was selected for future studies. It was confirmed that this strain can utilized caffeine by solid culture using natural substrates.

The high natural microflora present in raw coffee pulp or ensilaged coffee pulp requires a heat treatment in order to allow the development of selected strain. A thermal treatment is recommended previously to the fermentation process for further studies.

The effect of inoculation level on caffeine degradation was tested in raw coffee pulp or ensiled coffee pulp, results indicated that an inoculation of level of 10^6-10^7 spores g^{-1} moist substrate is required to degraded more than 94 % of the caffeine contained in ensiled coffee pulp after 4 days of culture.

More enzymatic studies are required in order to optimize the methodology of production of enzymes using natural substrates as raw and ensiled coffee pulp. Experimental evidence presented in this report contributed to set up the condition of solid state culture in order to set the basis of the scale up process for coffee pulp detoxification..

ACNOWLEDGMENTS

INCO-DC (ERB3514PL961577), EC; IRD, France; SRE, Mexico; CONACyT, Mexico.

REFERENCES

Aquiahualt M.A., Roussos S. & Trejo-Hernández M.R. (1988) Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: Isolation identification and physiological studies. Proceedings of the seminar Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials, M. Raimbault, ORSTOM (Eds.), Montpellier, France, 13-26.

Barrios J., Martínez C., Aguilera A. & Raimbault M. (1989) Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, 11: 551-554.

Beverini. M. & Metche M. (1990) Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus orizae*. *Sciences des Aliments*, 10: 807-816.

Bidochka J. & Khachatourians G.G. (1987) Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. and Environm. Microbiol.*, 53: 1679-1684.

Denis S. (1996) Degradation de la caffeine par *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp.: Etude physiologique et biochimique. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 180 p.

Gaime-Perraud I. (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decafeination de la pulpe de cafe. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 210 p.

Gaime-Perraud I., Roussos S. & Martínez-Carrera D. (1993) Natural microòrganisms in the fresh coffee pulp. *Micol. Neotrop. Apl.*, 6: 95-103.

Hakil M., Denis S., Viniegra-González G. & Augur C. (1998) Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 22:355-359.

Porres C., Alvarez D. & Calzada J. (1993) Caffeine reduction in coffee pulp through silage. *Biotech. Adv.*, 11,

Raimbault M. & Alazard D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Europ. Jour. of Appl. Microbiol. and Biotechnol*, 9: 199-209.

Roussos S., Aquiahualt M. A., Trejo-Hernández M. R., Gaime-Perraud I., Favela-Torres E., Ramakrishna M., Raimbault M. & Viniegra-González G. (1995) Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 756-762.

Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M. R., Lonsane B. K., Navarro J. M., Roussos S. & Raimbault M. (1994) On-line automated monitoring and control systems for CO_2 and O_2 in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29: 13-24

Schwan R.F. & Rose A.H. (1994) Polygalacturomase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *Jour. of Appl. Bacteriol.*, 76: 62-67.

Soccol C.R. (1992) Physiologie et metabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la degradation d'amidon cru et de la production d'acide L(+) lactique. Thèse de Doctorat. Université de Technologie de Compiegne Francia, 218*p*.

Zuluaga V.J. (1989) Utilización integral de los subproductos del café. In: Roussos S., Licona F.R. y Gutiérrez M. (Eds.), Memorias del I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera (I-SIBAC), México. pp 63-76.

EVALUATION OF *Penicillium sp.* V33A25 CAFFEINASE ACTIVITY IN RELATION TO ITS CONSERVATION METHOD

Gutiérrez-Sánchez G.[1], Perraud-Gaime I.[2], Augur C.[2], Romano-Machado J.[1], and Saucedo-Castañeda G.[1]

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, MEXICO
[2]IRD-México, Institut de Recherche pour le Dèveloppement, FRANCIA
[1]Corresponding author: Dr. Saucedo-Castañeda G., Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Av. Michoacán y La Purísima S/N, Iztapalapa, A.P. 55-535, México, D.F., C.P. 09340, MEXICO
Fax + (5)724-47-12, e-mail: saucedo@xanum.uam.mx

Key words: *caffeine, degradation, induction*

ABSTRACT

Caffeine degradation by Penicillium sp. strain V33A25 (PV33A25) was evaluated using a liquid culture medium prepared from a coffee infusion with an initial caffeine concentration of 0.5 g/L. After caffeine activity of the strain PV33A25 was induced, strain conservation was carried out four methods: 1)conserved in a coffee-agar medium, 2) coffee pulp-agar medium, and for the next two methods, the spores were harvested from 3) potato dextrose agar (PDA) medium, and 4) coffee-agar. The spores were lyophilized in the last two cases. The strain was adapted three times by subculturing on coffee agar medium before been used for the evaluation of caffeine degradation ability. It was observed that using methods 3 and 4 the fungi begin to degrade caffeine after 60 and 36 hours of culture, respectively. Nevertheless, with method 1, the fungi starts to degrade caffeine 12 hours after the inoculation time, reaching 92 % of caffeine degradation in a 72 hour period; with method 2, 39 % of degradation was observed within 72 hours but it was necessary to make 6 precultures to reach a similar degradation rate with method 2. The results of this study, suggest that the enzymatic activity responsible for caffeine degradation is inducible and once caffeine degradation ability is expressed it is important to conserve the strain in a medium with caffeine.

RESUMEN

Se evaluó la degradación de cafeína por Penicillium sp. strain V33A25 (PV33A25) empleando un medio de cultivo líquido preparado a partir una infusión de café con una concentración inicial de cafeína de 0.5 g/L. Una vez inducida la actividad cafeinasa de la cepa PV33A25, se procedió a la conservación de dicha cepa usando cuatro métodos: 1) la cepa fue conservada en medio café agar; 2) en medio pulpa de café agar y en los otros dos métodos las esporas se cosecharon a partir de medio, 3) agar papa dextrosa y 4) café agar, y las esporas fueron liofilizadas en los estos últimos dos casos. La cepa fue resembrada tres veces en medio café agar, antes de ser cultivada en el medio café líquido para evaluar su capacidad de degradación de cafeína . Se observó que con el método de conservación 3 y 4 el hongo empieza a degradar la cafeína después de las 60 y 36 horas de cultivo, respectivamente. Sin embargo, con el método de conservación 1, el hongo comienza a degradar la cafeína a las 12 horas, llegando a un 92 % de degradación de cafeína en 72 horas; con el método 2, hubo una degradación del 39 % a las 72 horas, pero es necesario hacer 6 resiembras para alcanzar una degradación similar a la obtenida por el método 2. Los resultados de este estudio, sugieren que la actividad enzimática responsable de la degradación de la cafeína es inducible y una vez expresada dicha actividad es importante conservar la cepa en un medio que contenga cafeína.

INTRODUCTION

Coffee pulp is one of the major subproducts available produced during the pulping operation of coffee cherries. One fraction of this material is used for compost production for coffee plant nurseries and the other part is spilled in rivers or piled up near them. For the 1997-98 period 14.92 million tons of fresh coffee pulp were produced in the world (Barreiro, 1999) and for every 2 ton coffee cherry processed, nearly 1 ton pulp is generated. Coffee pulp is essentially rich in proteins, minerals and fiber, nevertheless its utilization in animal feed is reduced notably due to the presence of toxic compounds difficult to degrade, such as caffeine, phenolics and tannins (Roussos, 1989). These compounds cause adverse effects on the animals that consume coffee pulp.

Silage of coffee pulp for conservation and its food value improvement, is an alternative for latter utilization of the coffee pulp. Silage is an anaerobic and fast process, which involves lactic

acid bacteria. It has been widely used for forage preservation in regions of moderate climate. Silage enables prevention of forage putrefaction with minimum degradation of the organic material. The process is faster and improves forage nutritional quality (Perraud-Gaime, 1995). Peñaloza in 1985, Gómez in 1985, and Aquiáhualt in 1992, carried out solid state fermentation studies with coffee pulp with an *Aspergillus niger* strain, in order to evaluate the improvement of the nutritional value. They reported proteic enrichment of the substrate but with no significant caffeine elimination. In this sense, utilization of coffee pulp for feed is constrained by antiphysiological (caffeine) and antinutritional (polyphenols) compounds.

The aim of this work was to study the effect of the expression of *Penicillium sp.* strain V33A25 caffeine-degrading enzymes after various conservation methods.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

Penicillium sp. strain V33A25 used in this study, came from the IRD-UAM collection (Roussos, 1995) and was selected because of its ability to use caffeine as nitrogen source (Roussos, 1995; and Denis 1996).

Culture media

The culture media composition used in this work are shown in Table 1. For CSA and CS, commercial coffee used was Grand'Mère "familial". The infusion was filtered by Whatman paper No. 41, salts were added, pH was adjusted to 5.5 using KOH, 0.1 M, agar was added and the end. The volume was adjusted to 1 L. In the case of CPA, fresh coffee pulp was milled in a blender for 5 minutes, then was heated until boiling, after addition of 750 mL of distilled water salts solution and agar were then incorporated. The culture medium was sterilized at 121°C for 15 minutes.

Table 1. Culture media used for strain conservation and spore harvest (Aquiahuatl, 1992; Denis, 1996).

Component	Medium (g/L)		
	CPA	CSA	CS
Saccharose	---	2.0	2.0
Milled coffee	---	40.0	40.0
Fresh coffee pulp	427.7	---	---
KH_2PO_4	1.73	1.3	1.3
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.16	0.12	0.12
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4	0.3	0.3
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.4	0.3	0.3
Agar	26.7	20.0	---

CPA: Coffee pulp agar medium; **CSA:** Coffee agar medium;
CS: Coffee saccharose medium

Culture conditions and strain conservation

Four methods were used for the evaluation of strain conservation associated to caffeine degradation: 1) strain was conserved on CSA, and 2) on CPA, for the next two methods, the spores were harvested from 3) PDA and 4) CSA and in both cases spores were lyophilized. The selected strain was precultured twice on CSA at 30°C for 6 days and caffeine degradation were evaluated on CS medium according to Denis methodology (Denis, 1996).

Caffeine analysis

Caffeine was extracted from liquid samples with 1 mL of a chloroform/isopropanol mixture (85:15; v/v) mixing in a vortex during 30 seconds and recovering the organic phase until three successive extractions. Solvent was evaporated in a heater and the extract was resuspended in 1.5 mL of deionized water. Caffeine was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using a modification to the technique reported by Denis, 1996; Sphersorb ODS-2 column, acetonitrile/tetrahidrofurane/deionized water (5:1:94; v/v/v), 1.5 $mL \cdot min^{-1}$ flow rate, room temperature, diodes array detector at λ=273 nm were used.

RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 1, caffeine concentrations related to the conservation methods proposed (see methodology), are shown. When the strain was conserved with the method 1 or 2, that is precultured previously 3 and 6 times on CSA, respectively, the degradation presented a 12 hour delay phase and degradation rates were near 0.01 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, in both cases, reaching 92 %

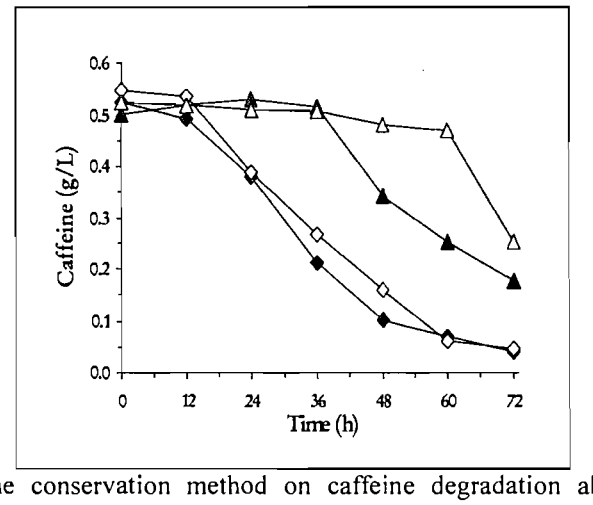


Figure 1. Influence of the conservation method on caffeine degradation ability. Method (◆) CSA, previously cultured three times on CSA; (◇) CPA, previously cultured six times on CSA; (▲) CSA_L, spores harvested from CSA and hlyophilized; (Δ) PDA_L, spores harvested from DA and lyophilized

degradation after 72 hours. In the case of conservation method in which lyophilized spores came from CSA the degradation began later (36 hours), which explains probably the relative spore damage suffered during the lyophilization rocess. In the case in which the spores are harvested from PDA medium it is observed that caffeine degradation begins after 60 hours. As way of comparison we can mention that Hakil (1998) obtained caffeine degradation greater than 90 % after 80 hour of incubation using CSA method.

In CSA liquid medium (Table I) caffeine degradation ability was induced due to the presence of caffeine as unique nitrogen source. These studies suggest that enzymatic activity responsible for caffeine degradation is inducible, due to the fact that degradation was increased considerably after repeated cultivation. Therefore, once caffeine degradation ability is expressed is important to conserve the strain on CSA medium, as to have a shorter reactivation period. There are no studies about the influence of the conservation method on the caffeine degradation ability.

Penicillium sp. V33A25 strain was able to degrade 92 % of total caffeine present at the beginning of the culture, after 72 hours of incubation. Therefore this strain will now used for the forthcoming degradation studies of caffeine present in ensiled coffee pulp.

ACKNOWLEDGEMENTS

Present work was supported in part by the National Council of Science and Technology (CONACYT, México), the Institut de Recherche pour le Développement (IRD-France) in the Universidad Autónoma Metropolitana (Mexico) and the BIOPULCA Project contract IC 18*CT970185.

REFERENCES

Aquiáhuatl, R. M. (1992) Destoxificación de la pulpa de café: morfología, fisiología y bioquímica de hongos filamentosos que degradan cafeína. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Barreiro Perera M. (1999) Coffee supply and demand balance (Más alla de nuestro campo). *Claridades Agropecuarias. Special edition*, pp 21-36

Denis S. (1996) Degradation de la cafeine par *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* Etude physiologique et biochimique. *PhD thesis, Université de Montpellier II, France*, pp 209.

Gómez-Bremes, R.A., Bendaña, G, González, J.M., Braham, J.E., Bressani, R. (1985) Relación entre los niveles de inclusión de pulpa de café y contenido proteínico en raciones para animales monogástricos. *Arch. Latinoam. Nutr.* 35:422-437.

Hakil, M., Denis, S., Viniegra-González, G. and Augur, C. (1998) Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. **22**:355-359.

Peñaloza, W., Molina, M.R., Gómez, R. & Bressani, R. (1985) Solid State Fermentation: An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:388-393.

Perrau-Gaime, I. (1995) Culture mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. *PhD thesis, Université de Montpellier II, Montpellier, France*, pp 209.

Porres, C., Alvarez, D., Calzada, J. (1993) Caffeine reduction in coffee pulp through silage. *Biotech. Adv.* 11:519-523.

Roussos, S., Aquiáhuatl, M. A., Trejo-Hernández, M. R., Perraud-Gaime, I., Favela, E., Ramakrishna, M., Raimbault, M., Viniegra-González, G. (1995) Biotechnological management of coffee pulp: Isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:756-762.

PRODUCTION OF EDIBLE MUSHROOM *Lentinus edodes* ON THE COFFEE SPENT GROUND

Fan Leifa, Ashok Pandey,Carlos Ricardo Soccol & R. Mohan

Laboratorio de Processos Biotecnologicos, Departamento de Engenharia Quimica, Universidade Federal do Parana, CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil

INTRODUCTION

Coffee spent ground is a residue produced in voluminous quantity (about I millions tons yearly) during the processing of instant products and family consume (Tango, 1971; Soccol, 1995; ICO, 1998). Brazil is a country producing the largest quantity of coffee spent ground in the world. This material was often composted as a soil conditioner, but it is also given to the waste depots (Thielke, 1989), resulting in lost of organic material or causing environmental pollution. *Lentinus edodes* is one of the most important edible mushrooms cultivated world-wide (Yang, 1985; Fan, 1990). It has excellent organoleptical properties of flavour and aroma, and possesses good nutritional and therapeutically values due to the presence of all essential amino acids required for humans. It also shows antitumoral activity, helps in reducing the cholesterol and strengthening the immunological system (Zhang 1989). *L. edodes* has been traditionally cultivated in the trunks of some hard trees (Yang, 1985). But a lot of reports have appeared on its cultivation on some agricultural residues in the world, especially in the mainland China (Yang, 1985; Zhang 1989).

The extracted coffee grounds, moistened with solution of 0,5% yeast extract at a ratio of 1:2 (W/V), were used for culture of *L.edodes* and the fruiting bodies were obtained (Thielke, 1989). But this technique is more expensive and not practical for production due to the addition of yeast extract. This work was to explore some techniques more practical for its cultivation in the Brazilian conditions or for the other developing countries and check possible biological efficiency. Water content and spawning rate are the parameters most important in the cultivation of edible mushroom, which affects directly the time of colonisation of mycelia (vegetative phase) and initiation of fructification. This work objects to determine those factors for better application.

MATERIALS AND METHODS

Micro-organism. *L.edodes* LPB 02, routinely maintained at 4 °C on PDA, was selected for this study because of its good growth characteristics on the extract of coffee husk.

Spawn preparation. The sawdust of *Eucalyptus sp* (80%) and rice bran (20%) were used for the spawn preparation. The mixture was adjusted at the moisture of 60% (Yang, 1985) and then filled in the flask. After autoclave and inoculation, the flask were incubated in the dark at 24 °C. The spawn in the flask was ready for inoculation to objective substrate after 20 days growth when the mixture has turned white totally.

Substrate preparation. The spent ground came from the solvent coffee factory after sun-dry. The effect of water content in the substrate and rate of inoculation ware conducted in the experiments. The concentration of water is at 45, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% and 75% respectively. The rate of inoculation is at 2,5, 5%, 10%, 15%, 20% and 25% respectively. The substrate was moistened and 4 hours later, was filled in autoclavable plastic bag (Cai, 1992). The bags were autoclaved at 121 °C for 1,5 hours. When inoculation, the spawn was separated into smallest particles. After inoculation, good mixture between spawn and substrate was made so that mycelial growing could be evaluated. After inoculation, the bags were incubated in the dark at 24 °C. mycelial development in the bag was observed each day after 5 days.

Fructification. The 100 g of dry spent ground each bag was used for the fructification. The humidity and spawn rate were adopted according to the results gained above. At the 30 days, the bags were transferred to a lighted environmental chamber, cotton plugs loosened to allow better aeration. After total transformation from whiteness to brown colour, the plastic was removed for fructification.

RESULTS

EFFECT OF WATER CONTENT ON THE MYCELIAL GROWTH OF *L. edodes* LPB 02 IN THE COFFEE SPENT GROUND

The Figure I shows that the humidity is very important for the mycelial growth of *Lentinus* on the coffee spent ground. It is observed that the humidity between 60-65% is better than that out of that range. It needs 12-14 days for the

occupation of mycelium at the humidity of 60-65% when the rate of spawning is at 15%. When the humidity is less than 50% or above 70%, the time of colonisation is taken longer more than two or three times. That means there is much more chance to contamination during the long period of vegetative phase.

ZADRAZIL (1981) studied the influence of water in the substrate on the mycelial growth of mushroom. According to them, the augment of water results directly a diminution of contents of air; but it is necessary to add ideal proportion of water for the development of the fungi. The results in this experiment are concordant with YANG (1986) who indicated that in the majority of substrate the humidity of 60-65% is suitable for the best growth of *Lentinus.*

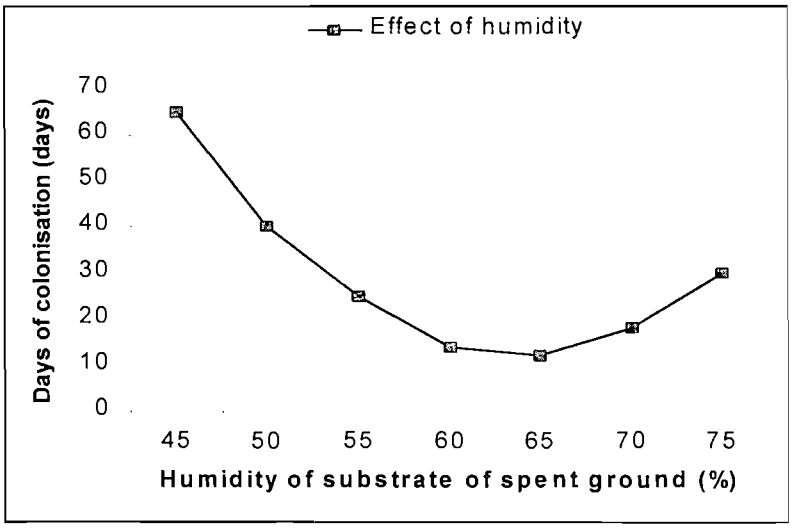


Figure 1 The effects of humidity on the mycelial growth in the coffee spent ground

EFFECT OF RATE OF INOCULATION ON THE MYCELIAL GROWTH OF *L. edodes* LPB 02 IN THE COFFEE SPENT GROUND

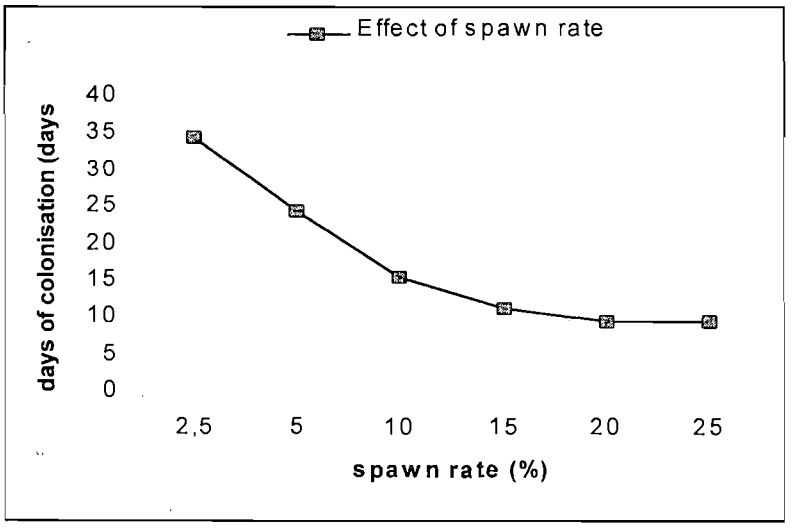


Figure 2 The effect of spawn rate on the colonisation of L.edodes LPB 02 in the substrate of coffee spent ground.

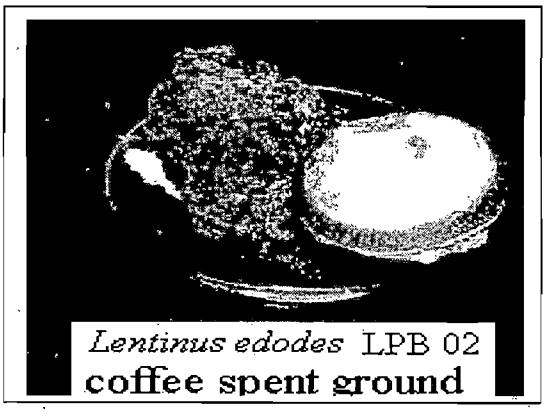
The Figure 2 demonstrates the effects of the spawn rate on the mycelial growth in the substrate of coffee spent ground by *L. edodes* LPB 02. It is observed that with the spawn rate of 15-25%, the time of colonisation is much less, being 10-12 days when humidity is at 60%. With the spawn rate of less than 5%, it needs more than 25 days for the occupation of mycelia.

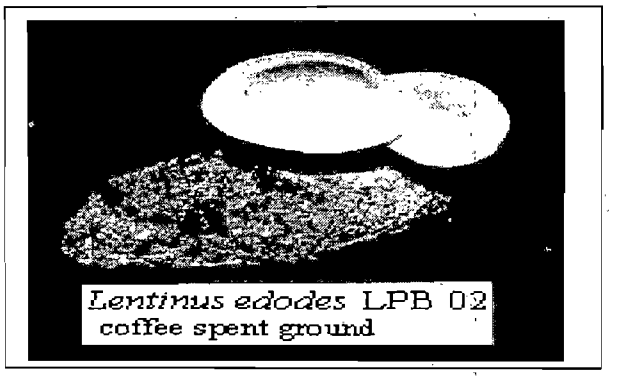
RAJARATHNAM e BANO (1987) believe that quantity of spawn below 10% promote contamination of substrate. They recommend more than 20% of spawn rate is better to promote a rapid colonisation of mycelia and more biological efficiency. Considering economy and efficiency, the spawn rate of 15% is recommended and adopted for the later work on the substrate of coffee spent ground.

FRUCTIFICATION AND BIOLOGICAL EFFICIENCY OF *L.edodes* LPB 02 IN THE SUBSTRATE OF COFFEE SPENT GROUND

The results above were adopted for the experiment of fructification, which were at the humidity of 65% in the substrate and at the experiment of fructification, which were at the humidity of 65% in the substrate and at the spawn rate of 15 %. First primordia appeared 60 days after inoculation. There was only one or two primordias at one time. The fruiting body lasts 7 days till maturity. Two or third flushes were harvested from one bag, but the size of fruiting body was generally reduced. Biological efficiency reaches 88,64% on an average.

Figure 3 and 4 some photos of fructification of L.edodes LPB 02 on the coffee spend ground.





DISCUSSION

The studies above showed that coffee ground is a good substrate for the cultivation of this fungus.This material is plentiful in Brazil and available all year round. The techniques for the cultivation is very simple, inexpensive, easily extended to the other region.

According to observation of growth of mycelia of this fungus, the spent ground also can be used as the material of the spawn for inoculation. To achieve more production, maybe additional wheat bran would have a more positive effect. For commercial purpose it must be more effective to replace the laboratory inoculation by a special spawning way or develop a mechanic way. Also more large bag should be used .

REFERENCES

Cai, W. M. and Fang, J.L. and Fan, L.F 1992 The disease of soft rotting in *Flammulina Velutipes* Edible mushroom, Shanghai, China.

Chang, S.T. 1989 Edible mushroom and their cultivation CRC Press, Inc. , Florida.

Fan, L.F. and Ding, C.K 1990 Handbook of mushroom cultivation Jiangxi science and technology publishing house, Jiangxi, China.

International Coffee Organization 1998 Total production of exporting members http://www.ico.org/proddoc.htm

SOCCOL, C.R. 1995 Aplicações da fermentação no estado sólido na valorização deresíduos agroindustriais. França-Flash Agricultura.

SOCCOL,C.R 1996 Aplicaciones Agroindustriales de los Processos de Fermentciones em Medios Solidos. Biotechnologia y Bioingeneria. Sociedade

Mexicana de Biotechnologia y Bioengeneria, Mexico.
Tango, J. S. 1971 Utilização industrial do café e dos seus subprodutos Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL São Paulo, Brasil.
Thiclke, C. 1989 Cultivation of edible fungi on coffee grounds Mushroom Science XII (parte II) Germany.
Yang, X. M. 1986 Cultivation of edible mushroom in China Agriculture printing house, Beijing, China.
Zadrazil, F. 1980 Conversion of different plant waste into feed by basidiomycetes European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin.

SOLID STATE FERMENTATION AND PRODUCTION OF *Pleurotus ostreatus* ON THE COFFEE RESIDUES

Fan Leifa, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol and Radjiskumar Mohan

Laboratorio de Processos Biotecnologicos, Departamento de Engenharia Quimica, Universidade Federal do Parana, CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil

INTRODUCTION

Coffee is one of the most important beverages of the world, produced about 1 millions tons yearly in more than 50 countries (ICO, 1998). At different stages from harvesting to the processing and consumption, several residues, viz. coffee husk, leaf and spent ground are generated about 200 millions tons yearly (Tango, 1971; Soccol, 1995). Brazil is a country producing the largest quantity of coffee solid residues in the world (ICO, 1998). Due to the presence of compounds like caffeine, tannins and polyphenols, these organic solid residues show toxic nature and thus have not been utilised beneficially. This has also led the problem of environmental contamination (Adams and Dougan, 1981; Bressani, 1979; Soccol, 1996).

The edible mushroom *Pleurotus sp.* , considered as a good alternative for proteic quality production foods in tropical countries (Bisaria, 1983; Yang, 1986; Chang, 1989), generally shows good ability of producing fruiting body and simultaneously reducing or degrading the toxic substances present in the substrate (Yang, 1986; Fan, 1990). The production of *Pleurotus* on the coffee pulp has been studied since 1984 (Martinez e Quirarte, 1984; Lozano, 1990 e Bermudez, 1994), but by that way it produced voluminous waste water during its washing-method of pasteurization of the mushroom production and the humid-processing of the coffee industry, causing environmental pollution. In Brazil, the coffee husk comes from the dry method, full of the nutrients, also full with caffeine, tannins, polyphenols, which is very different in the compositions from that of other countries. This work has objective to make good use of that residue, spontaneously resolve potential environmental problem.

Coffee leaf generally is not considered as a residue, but its volume during and after the harvesting difficult the manipulation of the crop, also facilitates epidemic of pathogens and pests. The coffee spent ground is another important residue, concentrated in the instant coffee product factory or scattered in the family during the consume. The spent ground, moistened with a solution of 0,5% yeast extract at a ratio of 1:2 (w/v), was used for experiment of *Pleurotus ostreatus* (Thielke, 1989). This work aims to produce this fungus for human consumption by an economic way based on the coffee residues and explore the possibilities of ration for animals.

MATERIAL AND METHODS

Micro-organism. 10 strains of *Pleurotus sp*, routinely maintained at 4 °C on PDA, was used for selection of the best strain on the extract of coffee husk. The procedure was adopted according to Soccol (1994).

Spawn preparation. The sawdust of *Eucalyptus sp* (80%) and rice bran (20%) were used for the spawn preparation. Th mixture was adjusted at the moisture of 60% (Yang, 1986) and then filled in the flask. After autoclave and inoculation, the flask were incubated in the dark at 24 °C. The spawn in the flask was ready for inoculation to objective substrate after 20 days growth when the mixture has turned white totally.

Substrate preparation. The coffee husk comes from the factory by dry method and spent ground came from the instant coffee-product factory after sun-dry. The leaf comes from some friends collected after the harvesting. The leaf was grinded after dry. These substrates were moistened with water, generally undertaken 4 or 5 hours before filling the autoclavable plastic bag. The bags were autoclaved at 121 °C for 1.5 hours. When inoculation, the spawn was separated into smallest particles. After inoculation, good mixture between spawn and substrate was made so that mycelial development could be rapid and uniform. After inoculation, the bags were incubated in the dark at 24 °C. mycelial development in the bag was observed and noted each day.

Fructification. After 20 days, the bags were transferred to a lighted environmental chamber, the plastic was removed to allow stimulation of air, humidity and light.

RESULTS

Selection Of Strains Of *Pleurotus Sp* On The Extract Of Coffee Husk In The Petri-Plate

The Figure 1 shows the colony characteristics of the different strains of *pleurotus sp* in this experiment. It was observed that the strain *P. ostreatus* LPB 09 is the best strain with more white and density of mycelia in this medium, the radial mycelial velocity being 9,68 mm/day and biomass 43,40 mg/plate in 9 days at 24 °C. So the strain *P.ostreatus* LPB 09 was selected out for the further studies.

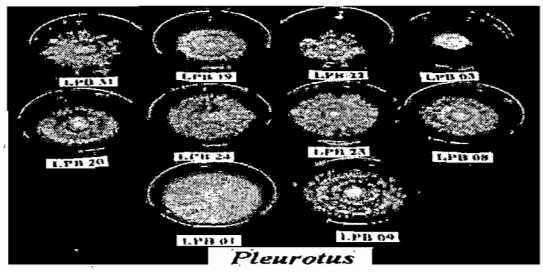


Figure 1 The colony characteristics of *Pleurotus* on the extract of coffee husk

SOLID STATE FERMENTATION AND FRUCTIFICATION OF *P. ostreatus* LPB 09 ON THE COFFEE HUSK

When coffee husk was used as the substrate, the ideal humidity for mycelial growth was worked out at the 55-65%; the best spawn rate at 10-15% was more efficient while it took 7 days for full occupation of mycelia; first fructification occurred after 20 days of inoculation; the biological efficiency reached at the 96,5%.

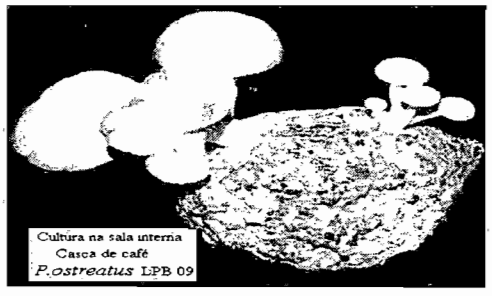


Figure 2 Fructification of *P. ostreatus* LPB 09 on the coffee husk

SOLID STATE FERMENTATION AND FRUCTIFICATION OF *P. ostreatus* LPB 09 ON THE COFFEE LEAF

When coffee leaf was used as the substrate, the ideal humidity for mycelial growth was worked out at the 60-70%; the best spawn rate at 10% was more efficient and economic while it took 5 days for full occupation of mycelia; but no fruit body was obtained in the unique leaf substrate.

SOLID STATE FERMENTATION AND FRUCTIFICATION OF *P. ostreatus* LPB 09 ON THE COFFEE SPENT GROUND

When coffee spent ground was used as the substrate, the ideal humidity for mycelial growth was worked out at the 50-55%; the best spawn rate at 10% was more efficient and economic while it took 6 days for full occupation of mycelia; first fructification occurred after 23 days of inoculation; the biological efficiency reached at the 90,35%.

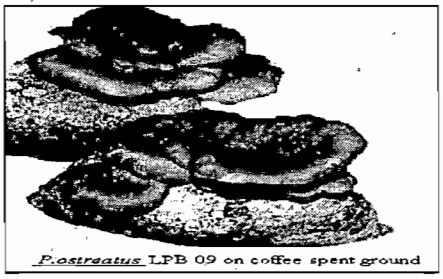


Figure 3 Fructification of *P.ostreatus* LPB 09 on the coffee spent ground

DISCUSSION

The studies above showed that coffee husk and spent ground are good substrates for the cultivation of this fungus. This material is plentiful in Brazil and available all year round. The techniques for the cultivation is very simple, inexpensive, easily extended to the other region. As to coffee leaf used in this experiment, no fruit body was harvested maybe because of the loosed texture or much more caffeine and tannins. After coffee leaf mixtured with coffee husk or spent ground at less than 50% de proportion, the fruit body was obtained and the biological efficiency reached at about 60%.

Through the analysis of the fruit body and remains after the fructification, we found that this fungus has not degraded the caffeine but it absorbed and accumulated the caffeine into the fruit body. The content of caffeine in the remains of coffee husk after the growth of mycelia and fructification was reduced up to 60,69%, tannins to 79,17%. The protein content in it was augmented while the cellulose was reduced. Also the texture of the remains was modified to more softly. It is more suitable as ration for animals.

According to observation of growth of mycelia of this fungus, the spent ground also can be used as the material of the spawn for inoculation. To achieve more production, maybe additional wheat

bran would have a more positive effect. For commercial purpose it must be more effective to replace the laboratory inoculation by a special spawning way or develop a mechanic way. Also more large bag should be used.

REFERENCES

Adams, M.R. and Dougan, J. 1981 Biological management of coffee processing waste Trop. Sci.

Bressani, R. 1979 Antiphysiological factors in coffee pulp Coffee pulp: composition, technology and utilization IGRC, Ottawa.

Bermudez, R.C. and Traba, J. A. 1994 Produccion de Pleurotus sp cfr. Florida sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba Micologia Neotropical Aplicada, Mexico.

Bisaria, R. and Madan, M 1983 Mushrooms: potencial protein source from cellulosic residues Enzyme and microbial technolgy, USA.

Chang, S.T. 1989 Edible mushroom and their cultivation CRC Press, Inc., Florida.

International Coffee Organization 1998 Total production of exporting members http://www.ico.org/proddoc.htm

Fan, L.F. and Ding, C.K 1990 Handbook of mushroom cultivation Jiangxi science and technology publishing house, Jiangxi, China.

Lozano, J.C. 1990 Produccion comercial del champinon (*Pleurotus ostreatus*) en pulpa de coffee Fitopatologia Colombiana, Colombia.

Martinez, D. and Quirarte, M. 1984 Prospects of growing edible mushroom on agro-industrial residues in Mexico Boletin de la sociedad Mexicana de micologia, Mexico.

Soccol, C.R. 1994 Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhyzopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus* Tese de Livre-Docência. UFPR,Curitiba,1994.228p.

Soccol, C.R. 1995 Aplicações da fermentação no estado sólido na valorização deresíduos agroindustriais. França-Flash Agricultura.

Soccol, C.R 1996 Aplicaciones Agroindustriales de los Processos de Fermentciones em Medios Solidos. Biotechnologia y Bioingeneria. Sociedade Mexicana de Biotechnologia y Bioengeneria, Mexico.

Thiclke, C. 1989 Cultivation of edible fungi on coffee grounds Mushroom Science XII (parte II) Germany.

Yang, X. M. 1986 Cultivation of edible mushroom in China Agriculture printing house, Beijing, China.

PRODUÇÃO DE AROMA FRUTAL POR *Ceratocystis fimbriata* EM RESÍDUO SÓLIDO DE AGROINDÚSTRIAS DE CAFÉ

M. Soares[1,2] ; P. Christen[3]; A.Pandey[1]; M. Raimbault[4]; C.R. Soccol [1]

[1] Laboratorio de Processos Biotecnológicos, UFPR, Brasil; [2] CEFET-PR UNED PG, Brasil; [3] Laboratoire de Microbiologie, IRD, Université de Provence, Marseille, França; [4] Laboratoire de Biotechnologie, IRD, Montpellier, França. Corresponding author.

INTRODUÇÃO

Apesar da maioria dos aromatizantes serem atualmente obtidos por síntese química(84%), pesquisas mostram a crescente preferência dos consumidores por alimentos naturais ou que contenham aditivos naturais(4). Plantas continuam sendo importantes fontes de óleos essenciais e aromas, mas há grande dependência em fatores de difícil controle, como clima e doenças. Uma alternativa à síntese de aromas naturais baseia-se nos processos microbiológicos, como fermentações (biosíntese) e bioconversões. O custo de produção de tais aromas pode ser questionado; contudo, o preço de mercado pago por aromas naturais é compensador. Por exemplo, a 4-decalactona sintética (aroma de impacto em pêssegos) custa 150 dólares/ Kg, enquanto seu similar natural custa 6000 dólares/ Kg(4). Fungos do gênero *Ceratocystis* sintetizam diferentes aromas frutais/florais (pêssego, abacaxi, banana, cítricos e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo, sendo que *C. fimbriata* é interessante devido ao seu rápido crescimento, habilidade na produção de esporos e à variedade de aromas sintetizados(5). Neste trabalho, procedeu-se a fermentação no estado sólido da casca de café com o intuito de avaliar a produção de aromas por *C. fimbriata*, comparando os resultados com outros mencionados para diferentes resíduos agroindustriais. A influência da adição de glicose e o uso de substâncias precursoras de aromas foram estudados. Os compostos biosintetizados presentes no headspace dos cultivos foram caracterizados e quantificados.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo

O microorganismo estudado foi *C. fimbriata* CBS 374-83. A manutenção da cepa e a coleta dos esporos transcorreram conforme descrito em literatura (1).

Preparo do substrato sólido

Duzentos gramas de casca de café, previamente seca (8% de umidade) e reduzida em partículas de diâmetro entre 0,4-0,8 mm, foram misturados a um litro de água destilada e tratados em vapor fluente por 45 min. Após simples filtração as frações líquida e sólida foram separadas, sendo que estudos preliminares demonstraram que esta mostrou-se mais apropriada à produção de aromas do que a casca e do que a fração líquida, provavelmente devido à eliminação de sais e/ou outras substâncias.

Procedimentos de fermentação

Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250mL, contendo 15g de matéria seca (MS) e cobertos com 8 camadas de gaze. Em todos os experimentos as condições iniciais foram: temperatura 30°C, pH 6, inóculo $1x10^{-7}$ esporos g^{-1} MS e 70% de água (máxima absorção do substrato)(1;3). A influência da adição de glicose (20%, 35% e 46%) e da adição de possíveis precursores (leucina 10 mMol (2), óleo de soja 10%(1) e solução salina(2)) foram estudadas para otimização da produção de voláteis totais (VT).

Procedimentos analíticos

Cada experimento foi realizado em triplicata. O acompanhamento da evolução da produção dos voláteis foi realizada através de avaliações sensoriais paralelamente à análise por Cromatografia de Gases (CG). Os compostos foram identificados no headspace dos cultivos comparando seu tempo de retenção com padrões. Voláteis totais e álcoois foram expressos em equivalente de etanol µmol por Litro de headspace por grama de matéria seca (µmol/L gMS) e ésteres, da mesma forma, como equivalente de etil acetato, ambos a partir de curvas padrões (3).

Análise dos dados

Os dados obtidos por cromatografia foram integrados com o objetivo de calcular os voláteis totais acumulados durante a fermentação. O modelo logístico de Gompertz foi utilizado para proceder esta integração e calcular o tempo de máxima produção e a velocidade de produção dos voláteis(3).

RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES

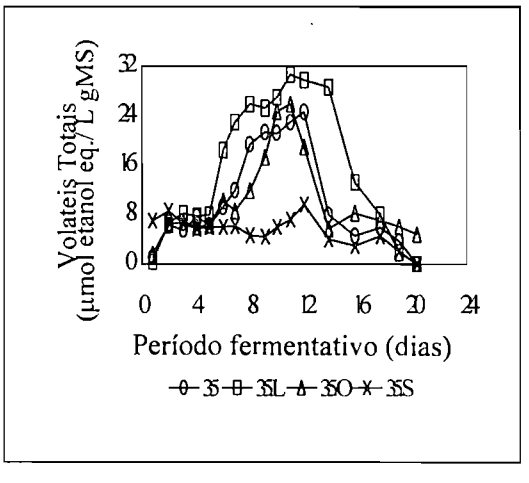
Produção de voláteis: efeito da adição de glicose.

Para as adições de 20% e 35%, um forte aroma de abacaxi foi percebido (Tabela 1). O aroma detectado depende da concentração de glicose adicionada ao meio de cultivo, indicando que possivelmente este fator orienta o metabolismo do fungo na síntese de diferentes compostos. Em concentrações mais elevadas de glicose a intensidade do aroma foi comprometida (Figura 1). Isto tanto pode ocorrer devido à concentração de glicose, à disponibilidade de nitrogênio ou à diminuição da atividade de água que provavelmente ocorre nestas condições.

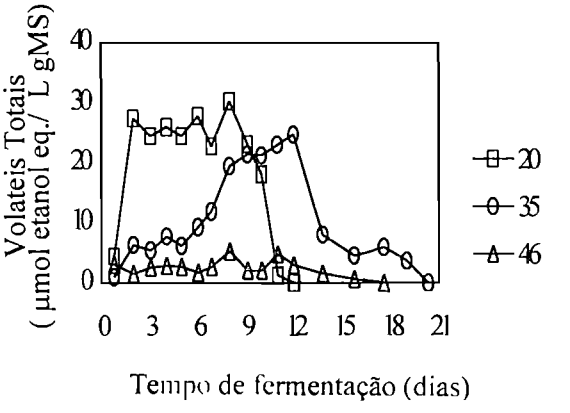
Tabela 1: Avaliação sensorial do headspace dos cultivos com diferentes adições de glicose para *C. fimbriata* cultivado em casca de café.

Glicose(%)	tmax*(dias)	Intensidade
20	6	+++abacaxi
35	10	+++ frutal-abacaxi
46	8	+ banana passa

Intensidade do aroma: fraca (+), forte (+++)
* tmax: tempo de máxima percepção do aroma.



A Figura 1a mostra a evolução dos voláteis totais durante o período fermentativo. Parece mais interessante a adição de menores concentrações de glicose ao substrato; contudo, percebe-se que o fungo suporta concentrações de glicose na ordem de 46%.



A Figura1b mostra a evolução dos voláteis totais medidos no headspace dos cultivos suplementados com diferentes concentrações de glicose.

Este estudo não é conclusivo, mas demonstra que a intensidade de produção dos aromas e a velocidade de produção dos mesmos varia com a adição de glicose. Comparando o tempo fermentativo deste microorganismo na casca de café (Figura 1) com outros substratos mencionados na literatura (3), por exemplo bagaço de mandioca e de maçã – 5 e 4 dias respectivamente, percebe-se que o fungo está melhor adaptado à casca de café. Apesar da produção no meio com 35% ser mais longa, aquela do meio com 20% foi mais rápida.

Na Tabela 2, os parâmetros calculados a partir da integração dos voláteis estão apresentados. O modelo mostra-se adequado, visto que todos os coeficientes R^2 são superiores a 0,994. Mesmo sem ter sido completamente otimizado os resultados da produção de voláteis totais em casca de café foi superior aos valores mencionados na literatura para outros resíduos (farelo de trigo e bagaço de mandioca 93 e 421 µmol/L gMS, respectivamente)(3).

Tabela 2: Adição de glicose: constantes cinéticas (modelo de Gompertz)

Glicose (%)	VTacum.*	K (h^{-1})	tmax (dias)	R^2
20	6,58	0,0123	5,2	0,997
35	5.39	0,0093	8,9	0,994
46	1,20	0,0045	7,1	0,997

*Voláteis totais acumulados durante a fermentação (mmol etanol eq./L gMS)
tmax: dias de máxima produção do aroma
K: velocidade de produção

Produção de voláteis: efeito da adição de leucina, óleo de soja e solução salina.

Este estudo foi feito com adição de glicose de 35%. Os aromas detectados por olfatometria estão presentes na Tabela3.

Tabela 3: Avaliação sensorial do headspace dos cultivos de *C. fimbriata* em casca de café (35% glicose)adicionado de determinados compostos.

Substância	tmax*(dias)	Intensidade
SS	10	+ banana
O	10	++ banana
L	10	+++ banana

Intensidade do aroma: fraco (+), médio (++), forte (+++) tmax: tempo de máxima percepção do aroma
SS : solução salina(2); O :10% de óleo de soja(1); L :10 mMol de leucina(2).

Em todos os casos um agradável aroma de banana foi notado, mais intenso quando o meio foi adicionado de leucina. Os parâmetros calculados pelo modelo de Gompertz (Tabela 4) indicam que a adição de óleo de soja ao meio não melhorou a produção total de voláteis, que foi similar ao meio controle, indicando que o fungo não assimila este substrato para metabolismo primário, tampouco o utiliza como precursor do metabolismo de metil-cetonas como outros fungos (*Penicillium roquefortii*, por exemplo). A adição de solução salina diminuiu drasticamente a produção dos voláteis, mas leucina atuou inversamente (Figura 2). Isto indica que o substrato já possui suficiente concentração de sais e que o fungo degrada a leucina segundo a rota de Erlich a isoamil alcool, o qual é então esterificado em isoamil acetato, o qual é o maior componente de aromas de banana.

Tabela 4: Adição de leucina, solução salina e óleo de soja: constante cinéticas segundo o modelo de Gompertz.

Substância	VTacum.*	K (h^{-1})	tmax (dias)	R^2
-	5,39	0,0093	8,9	0,994
O	5,7	0,0085	9,5	0,996
L	8,81	0,0098	9,4	0,997
SS	2,8	0,0067	12	0,996

O, L e SS como para Tabela 3.
*Voláteis Totais acumulados durante a fermentação (µmol etanol eq./L gMS)
tmax: tempo de máxima produção do aroma
K: velocidade de produção

Após o tratamento da casca com vapor fluente ocorreu uma diminuição na quantidade de sais na ordem de 30% e, conforme observado previamente, este tratamento aumenta a produção de VT. Da mesma forma, a adição de uma solução salina ao resíduo afetou a produção de VT. Este estudo não permiteconcluir se este efeito é negativo em relação ao crescimento ou diretamente à produção de voláteis.

Figura 2: Evolução dos VT medidos no headspace dos cultivos com 35% de glicose (-, controle) e suplementado com leucina (L), solução salina (SS) e óleo de soja (O).

A análise por Cromatografia de Gases permitiu a identificação de diversos compostos, como indicado na Tabela 5, que apresenta os dados integrados para cada composto presente no headspace dos cultivos. A adição de leucina aumenta a produção de ésteres derivados do metabolismo deste aminoácido. Todos os compostos já foram mencionados previamente por outros autores (1,2,3).

Tabela 5: Total individual dos voláteis medidos no headspace dos cultivos de *C. fimbriata* (dados integrados).

Compostos	**20**	**35**	**35.O**	**35.L**
Acetaldeído *	47	57	58	50
Etanol *	329	428	607	565
Isopropanol *	26	5	-	11
Etil acetato**	2078	1833	1841	2811
Etil isobutirato **	11	10	7	15
Isobutil acetato **	19	18	15	35
Etil butirato **	9	3	1	21
Propil acetato **	4	-	-	-
Isoamil acetato **	2	11	-	16
2- heptanona *	-	-	-	3
2-octanona *	52	67	3	30
Etil 3 hexenoato **	-	-	-	3

20: 20% glicose; 35: 35% glicose (controle); 35.L: com leucina;
35.O: com óleo de soja.
* expresso em equivalente de etanol µmol / L gMS :
** expresso em equivalente de etil acetato µmol / L gMS.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resíduo de casca de café tratada com vapor fluente é um substrato adequado à produção de aromas por *C. fimbriata*. A adição de glicose é necessária à esta proposta e a concentração adequada compreende-se entre 20% e 35%. A adição de leucina aumentou em 58% a produção de VT. Comparando os resultados com outros da literatura percebe-se que a produção total foi duas vezes superior aos melhores resultados obtidos com bagaço de mandioca, senso que este havia sido adicionado de solução de leucina 15 vezes mais concentrada (3). Contudo, os compostos identificados foram os mesmos em ambos trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-BRAMORSKI,A. et al. *Biotechnology Letters,* 20 (4): 359-362, 1998.

2-CHRISTEN,P et al. *Biotechnology Letters*; 13 (7): 521-526, 1991.

3-CHRISTEN,P et al. *Mycological Research.* 101 (8):911-919, 1997.

4-JANSSENS,L et al. *Process Biochemistry.* 27:195-215, 1992.

5-SENEMAUD,C. Ph.D. Thesis, France, 1988.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger* LPB 21 EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO COM CASCA DE CAFÉ

Luciana P.S. Vanderberghe[1,2], Ashok Pandey,[1] Jean-Michel Lebeault[2] and Carlos R. Soccol[1]*

[1]Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia Quimica, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-970 Curitiba-PR, Brazil; [2]Laboratoire de Procédés Biotechnologiques, Génie Chimique, Université de Technologie de Compiègne, 60205-Compiègne, Cedex, France

O Brasil é o maior produtor de café no mundo com uma produção anual (1997-1998) estimada em 18.86 milhões de sacas. O processamento do café gera grandes quantidades de resíduo sólido (casca de café ou polpa de café a depender do modo de processamento). Atualmente, não existe nenhuma aplicação para a casca de café consistindo em um grande problema ambiental. Portanto, o uso desse substrato em processos para a produção de produtos de interesse comercial, seria de extremo interesse econômico.

Apesar da fermentação no estado sólido (FES) oferecer inúmeras vantagens em relação à fermentação submersa (FS), a produção do ácido cítrico se dá quase que totalmente por FS, principalmente com meios a base de amido e sacarose, utilizando fungos filamentosos (Pandey, 1992, Soccol, 1998, Vandenberghe *et al.*, 1998).

O presente trabalho tem como principal objetivo a produção do ácido cítrico em FES pelo cultivo de uma linhagem de *Aspergillus niger* em casca de café. O resíduo foi impregnado com hidrolisado de bagaço de mandioca (BM), um resíduo rico em amido (cerca de 60-70%) e também abundante no Estado do Paraná. A hidrólise enzimática do BM, transformação do amido em açúcares (glicose e maltose) foi realizada. As etapas de otimização deste pré-tratamento foram apresentadas, assim como os procedimentos para a fermentação sólida.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos: *Aspergillus niger* LPB 21 foi selecionada para este estudo. A cepa foi conservada em meio Potato Agar Dextrose (PDA), mantida a 4°C e renovada mensalmente.

Inóculo: Os esporos de *A. niger* foram produzidos em PDA (50 mL) distribuído em frascos Erlenmeyer de 250 mL e incubados a 30°C durante sete dias. A suspensão de esporos foi preparada com a adição de 25 ml de água destilada com Tween-80 (0.1%) e conservada a 4° C por no máximo duas semanas.

Hidrólise enzimática: O bagaço de mandioca em uma concentração de 120 g/L de água potável, contendo uma quantidade necessária de cálcio para garantir a boa estabilidade das enzimas, foi gelatinizado a 100-110°C durante 15 minutos. O substrato foi então incubado com Termamyl 120 L (α-amilase) e, em seguida, com AMG 200 L (amiloglicosidase) de acordo com o plano experimental citado abaixo. Após a hidrólise as enzimas foram inativadas a 100-104°C durante 10 minutos para evitar a permanência de resíduos no hidrolisado. Finalmente, as amostras foram filtradas e analisadas.

Plano fatorial 1: O início dos experimentos foi baseado em um plano fatorial do tipo 2^4, com pontos centrais, variando as concentrações das duas enzimas, α-amilase e amiloglucosidase. Os fatores estudados e os níveis correspondentes são citados na Tabela 1.

Tabela 1. Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca – Plano fatorial 1

Nível	Tempo de Hidrólise Termamyl, h	Tempo de Hidrólise AMG, h	Concentração Termamyl, µL/100 g de amido	Concentração AMG, µL/100 g de amido
-1	1	12	100	231
0	2	24	200	471
+1	3	36	300	711

Plano fatorial 2: O segundo plano experimental foi definido à fim de otimizar as condições da hidrólise enzimática definidas pelo plano experimental precedente. Sendo assim, os resultados em açúcares foram observados e a análise estatística apontou os fatores mais significativos. A Tabela 2 apresenta os níveis dos fatores selecionados para esta etapa do estudo. Os únicos fatores significativos foram aqueles relacionados à amiloglucosidase. Consequentemente, o tempo de hidrólise e a concentração da enzima of α-amilase forma mantidos constantes nos seus níveis baixos, concentração de 100 µL/100 g de amido e 1 hora de incubação.

Tabela 2. Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca - Plano fatorial 2

Níveis	Tempo de hidrólise AMG h	Concentração da AMG, µL/100 g de amido
-1	12	471
0	18	591
+1	24	711

A terceira parte deste estudo relacionou a influência do tamanho das partículas na hidrólise enzimática do BM. Foram testadas partículas grossas e finas.

Fermentação:
A fermentação foi realizada com a casca de café, impregnada com hidrolisado de bagaço de mandioca. O hidrolisado de mandioca foi enriquecido com $MgSO_4.7H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ e metanol e, em seguida foi misturado ao suporte, a casca de café. A umidade inicial foi fixada em 65%. A fermentação foi realizada com *A. niger* LPB 21 a 26°C por 120 horas.

Métodos analíticos:
As amostras da fermentação (5 g) foram bem homogeneizadas e 50 mL de água destilada foram adicionados para a extração do ácido cítrico e dos açúcares. Após uma filtração, todas as amostras, inclusive as da hidrólise enzimática, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com um aparelho Shimadzu LC-10AD HPLC. Foram empregadas temperatura de 60°C e 5mM H_2SO_4 como fase móvel com uma vazão de 0.6 mL/min. O ácido cítrico e os açúcares foram detectados por um refratômetro diferencial (Shimadzu RID-10A). Outros parâmetros, pH e umidade, foram determinados conforme métodos apresentados por Soccol (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plano fatorial 1: Os resultados apresentados na Tabela 3, mostram a média de dois experimentos. Aparentemente, os melhores resultados foram obtidos nos pontos centrais, cuja média foi de 50.2 g/L de açúcares. No entanto, a análise estatística mostra que esse não seria ainda o ponto ótimo. Uma nova região deveria então ser pesquisada.

Tabela 3. Resultados obtidos para o Plano experimental 1

Experimento	Tempo de hidrólise Termamyl, h	Temp de hidrólise AMG, h	Concentra-ção da Termamyl, µL/100 g de amido	Concentração da AMG,µL/100 g de amido	Açúcares redutoresg/L
1	0	0	0	0	49.66
2	-1	-1	-1	- 1	34.52
3	-1	+1	+1	+1	39.63
4	-1	-1	-1	+1	39.92
5	+1	-1	-1	+1	43.91
6	0	0	0	0	50.74
7	+1	-1	-1	- 1	37.41
8	-1	+1	-1	- 1	30.66
9	+1	+1	+1	- 1	30.58
10	+1	-1	+1	+ 1	44.02
11	0	0	0	0	50.89
12	-1	-1	+1	- 1	34.03
13	-1	+1	-1	+1	40.61
14	-1	+1	+1	- 1	36.55
15	+1	+1	-1	+1	40.57
16	0	0	0	0	48.51
17	-1	-1	+1	+1	45.10
18	+1	+1	-1	- 1	33.96
19	+1	-1	+1	- 1	40.00
20	+1	+1	+1	+1	38.88
21	0	0	0	0	51.03

Os gráficos apresentados na **Figura 1** e a análise da variância (resultados não apresentados) confirmaram que o tempo de hidrólise e a concentração da enzima Termamyl não foram significativos

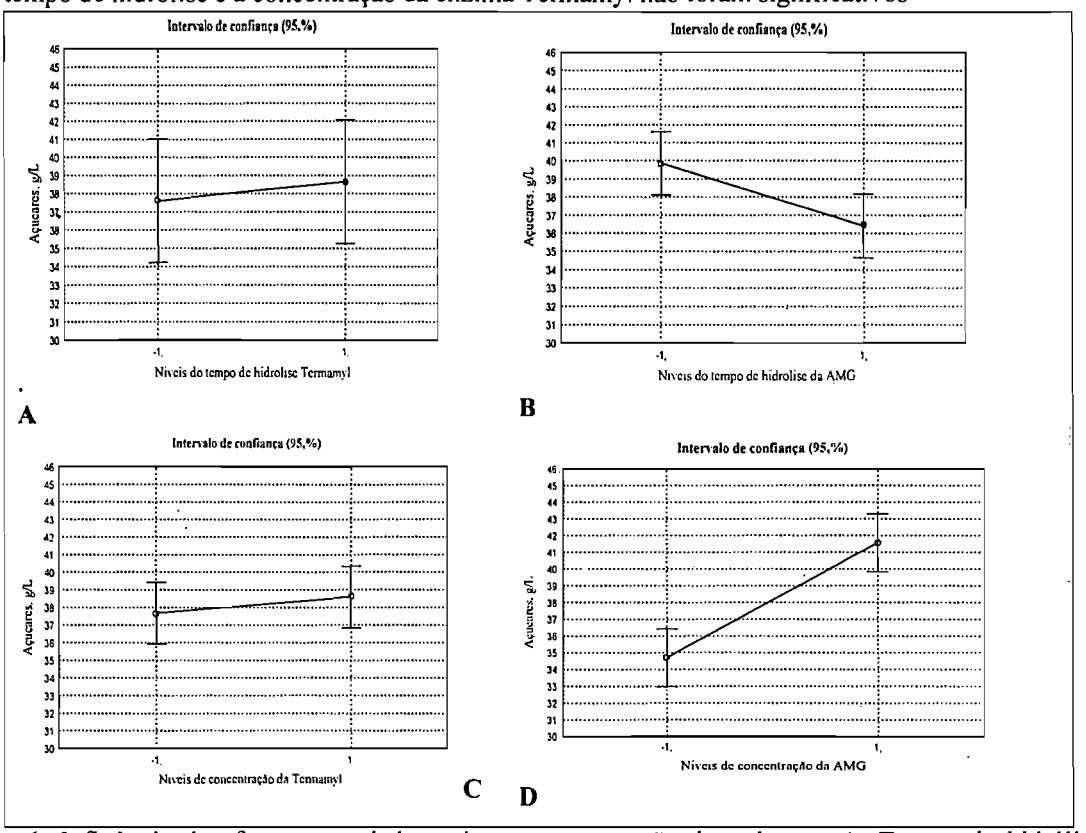


Figura 1. Influência dos fatores estudados sobre a concentração de açúcares. A. Tempo de hidrólise da Termamyl; B. Tempo de hidrólise da AMG; C. Concentração da Termamyl; D. Concentração da AMG.

No caso da enzima AMG, pode-se concluir que a área entre os níveis 0 e –1 (12 e 24 horas) para o tempo de hidrólise, e 0 e +1 (471 e 711 μL of AMG/ 100 g de amido) para a concentração, deveria ser testada na próxima etapa de otimização. Uma vez que a variação dos níveis da enzima Termamyl não foram significativos, foram mantidos constantes nos pontos mínimos na etapa seguinte.

Plano fatorial 2: Conforme a Tabela 4, a concentração da enzima AMG não foi significativa. De fato, a concentração de açúcares de 77.1 g/L e 77.9 g/L, relacionadas aos pontos 3 e 6, respectivamente, foi obtida com os níveis baixo e alto da concentração da enzima AMG, destacando a não influência deste fator na hidrólise enzimática. Um longo tempo de hidrólise, determinado como o fator mais significativo da hidrólise, foi compensado pela baixa quantidade de enzima utilizada. A Figura 2 apresenta o gráfico de superfície resposta obtido para esta etapa. Conforme a projeção estatística, tempos mais longos de hidrólise poderiam melhorar ainda mais o processo de hidrólise. Nas condições empregadas, o hidrolisado final continha 77.9 g/L de açúcares fermentescíveis, representando uma eficiência da hidrólise de 82 %. Dentre os açúcares 95.2 % de glucose e 4.8 % de maltose, comprovando a especificidade da hidrólise enzimática. Até este estágio, o bagaço de mandioca apresentava uma granulometria entre 0.84 e 2.0 mm. Contudo, Foi observado que com essa granulometria a viscosidade era um pouco elevada dificultando o ataque das enzimas ao amido. Foi então empregado um tamanho de partículas menor, <0.84 mm. Consequentemente, concentrações de 86.80 g/L de açúcares (91% de conversão) foram atingidas, mostrando a grande importância da granulometria neste estudo.

Tabela 4. Resultados obtidos para o plano fatorial 2

Experimento	Tempo de hidrólise da AMG, h	Concentração da AMG μL/100 g de amido	Açúcares g/L
1	0	0	78.80
2	- 1	+1	72.80
3	+1	+1	77.10
4	0	0	72.80
5	- 1	-1	58.60
6	+1	-1	77.90
7	0	0	78.80

Produção de ácido cítrico: Os resultados da fermentação mostraram uma produção de ácido cítrico de 12.7 g/kg D.M. usando o hidrolisado de BM, como substrato, impregnado na casca de café, como suporte, por *Aspergillus niger* LPB 21 em FES. Certamente, esses resultados não são satisfatórios, entretanto indicam novas perspectivas para o processo de produção do ácido cítrico. Uma otimização do processo, ou seja, das condições da fermentação se faz necessária.

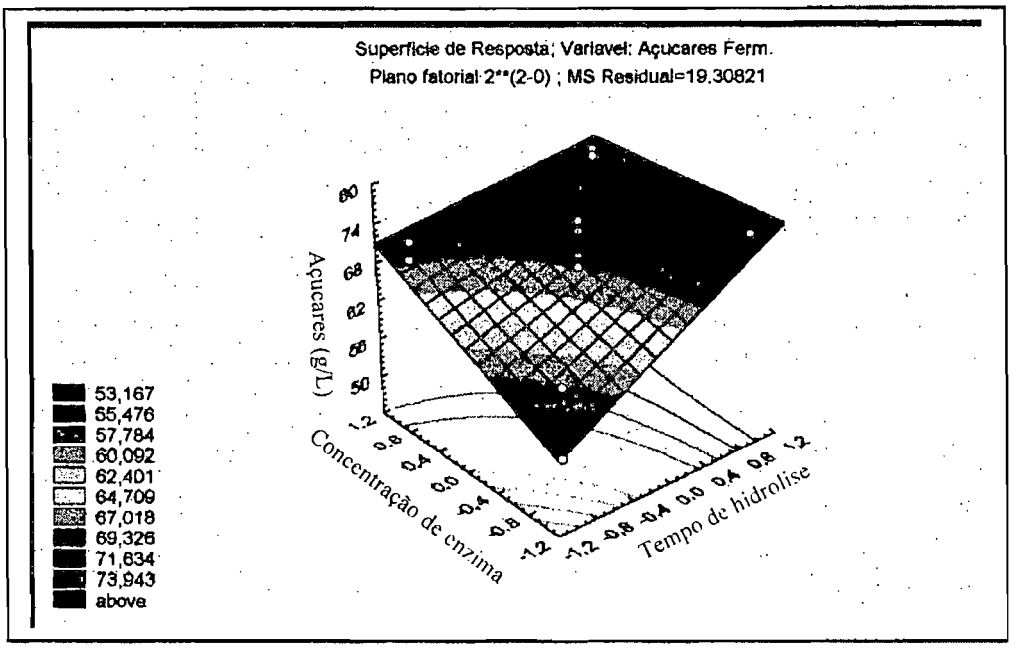


Figura 2. Superfície de resposta obtida para o plano fatorial 2. Efeito dos níveis do tempo de hidrólise e da concentração da enzima AMG sobre a hidrólise enzimática.

CONCLUSÕES

Foi produzido 12.7 g de ácido cítrico/kg D.M. mostrando a possibilidade de usar a casca de café como suporte impregnado com hidrolisado de bagaço de mandioca (BM) em fermentação no estado sólido por *Aspergillus niger*. As melhores condições para a hidrólise enzimática foram:
70 μL de Termamyl 120L/100 g de BM por 1há 90°C,pH6.9; 400μL de AMG 200L/ 100 g de CB por 24 h a 60°C, pH 4.5 e tamanho de partícula <0.84 mm. A conversão da hidrólise foi de 91% representando 86.8 g/L de açúcares fermentescíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES , ao CNPq e a União Européia (projeto INCO DC: No. CT970185) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Soccol, CR *et al.* (1998) In- *Advances in Biotechnology*, A. Pandey (ed.), Educational Publishers and Distributors, New Delhi, pp. 25-40
Pandey, Ashok (ed.) (1994), *Solid State Fermentation*, Wiley Eastern Limited, New Delhi, pp. 188.
Pandey, A. (1992) Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, 27, pp.109-117.
Vandenberghe, L. P.S. *et al.* (1998) *Festschrift Vol*, International Symp on Microbial Biotechnology for Sustainable Development. and Productivity, Nov. 14-16, Jabalpur, India, IB-4

LA PULPA DE CAFE ES UN SUBPRODUCTO Y NO UN DESECHO

Jose R. Ramirez Martinez

Universidad Nacional Experimental Del Tachira (Unet)San Cristobal, Estado Tachira, Venezuela

La pulpa de café que se obtiene mediante el beneficio húmedo de las cerezas de café generalmente se considera como un desecho y los métodos comunes para deshacerse de este material incluyen la descarga en los cursos de agua o el amontonamiento en terrenos agrícolas cercanos. En los países productores de café ésto constituye una fuente muy severa de contaminación y un problema ambiental muy serio. Por esta razón, desde mediados del presente siglo, se han hecho esfuerzos para desarrollar métodos para su utilización como materia prima en la producción de alimentos para animales, bebidas, vinagre, biogas, cafeína, pectina, enzimas pécticas, proteína y abono orgánico. El uso de la pulpa fresca o procesada ha sido objeto de numerosos estudios los cuales, en general, han conducido a la conclusión de que se puede usar para sustituir parte de los costosos ingredientes de la dieta de algunos animales de la finca. En el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) de Guatemala se llevó a cabo un intenso programa de investigación en los años 70 sobre la factibilidad de la utilización de la pulpa de café (Bressani, R. y Braham, J. C., Eds., *Pulpa de Café. Composición, tecnología y utilización*, CIID, Bogotá, Colombia, 1979). El énfasis de estos estudios fué sobre su uso potencial como un ingrediente para complementar las raciones de los animales de la finca, lo cual tiene con el tiempo implicaciones económicas para los países productores de café. Los resultados reportados mostraron que la pulpa de café puede reemplazar hasta un 20% de los concentrados comerciales en la alimentación del ganado lechero sin efectos adversos y con un ahorro de 30% en los costos. Los resultados en general de los estudios de alimentación de cerdos mostraron que el maíz puede ser reemplazado por pulpa de café deshidratada hasta un 16% de la ración total sin efectos detrimentales sobre la ganancia de peso y la conversión alimenticia. Esto significa que al final del período de engorde cada cerdo producido ha dejado cerca de 50 kgs. de maíz disponibles para consumo humano u otro uso alternativo.

Mas recientemente, un estudio sobre la utilización de la pulpa de café en la alimentación de ganado lechero se llevó a efecto en la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay (Méndez Medina, J. B., 1986). Una cantidad conocida de pulpa de café fresca y alimento concentrado (1 kg. por kg. de leche producida) se les suministró separadamente temprano en la mañana y pasto de corte *ad libitum* durante el resto del día. Se observó que en general el consumo de pulpa de café por los bovinos mejoraba la mayoría de sus parámetros productivos. En animales jóvenes la ganancia de peso fué ligeramente mejor que en aquellos a los cuales no se les suministró pulpa de café. Aunque los animales productores de leche tuvieron una ganancia de peso más baja cuando se les alimentó parcialmente con pulpa de café, ellos mostraron un ligero aumento en producción de leche y un aumento significativo en el contenido de grasa.

En algunos países productores de café la cosecha del cultivo coincide con la estación seca; bajo esta circunstancia, la pulpa de café puede reemplazar ventajosamente el pasto de corte que se le suministra al ganado lechero. La pulpa de café está disponible sólo durante cerca de la mitad del año y es muy perecedera. Por consiguiente, requiere un manejo y una preservación apropiados si se quiere extender el período de su uso. Una manera de manejar y preservar las grandes cantidades de pulpa de café que se produce es por medio del ensilaje. En este proceso el material vegetal a ser ensilado se mantiene en un recipiente impermeable al aire y al agua con el fin de proveer condiciones que prevengan su descomposición. El material ensilado mantiene su valor nutritivo y puede utilizarse o deshidratarse inmediatamente después de la apertura del silo. El silo para hacer el ensilaje puede tener una estructura permanente, pero los silos de fosa son baratos para construir, requieren poco espacio y proveen un alto grado de protección. El interior de la fosa se cubre con una tela de plástico para proteger el silo del contacto con el suelo y se provee un drenaje en el fondo. La parte superior se cubre con una tela de plástico y encima suelo para proteger la pulpa de café de la lluvia y mantener las condiciones anaeróbicas.

Recientemente se llevó a cabo un estudio sobre la producción y evaluación nutricional de la pulpa de café ensilada con los esfuerzos conjuntos de varias universidades. Los resultados preliminares de este estudio fueron presentados en la 17ª Conferencia Internacional de Ciencia del Café que se realizó en Nairobi, Kenia, del 20 al 25 de julio de 1997. Se preparó un total de 190 minisilos cilíndricos, cada uno con una capacidad de 3 kgs. de pulpa de café proveniente del beneficio húmedo. Se corrieron por cinco períodos de incubación dos series distintas de cuatro tratamientos experimentales los cuales incluyeron diferentes tipos de aditivos y los correspondientes controles.

Al final de cada período de incubación se midió la temperatura interna de cada minisilo y se tomaron muestras para determinar la cantidad de bacterias ácido lácticas, pH, materia seca, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, azúcares solubles, compuestos fenólicos simples, taninos condensados, y cafeína. Se encontró que la composición del ensilaje dependía en gran parte del origen y manejo de la pulpa de café a ser ensilada; este hecho explica los resultados controversiales reportados a menudo .

Sobre la base de los resultados que se obtuvieron con los minisilos, se procedió a preparar seis silos cilíndricos grandes (cada uno con una capacidad de tres metros cúbicos) para producir la cantidad de pulpa de café ensilada (PCE) proveniente del beneficio húmedo requerida para realizar experimentos de alimentación con animales. Los silos se mantuvieron cerrados por más de 100 días y se abrieron cuando los experimentos de alimentación animal estaban listos para empezarse. Los experimentos de alimentación se realizaron con cerdos, peces, pollos, ovejos y conejos. Estos experimentos incluyeron la determinación de ganancia diaria de peso, consumo de materia seca diaria y eficiencia de la conversión alimenticia. Los cerdos alimentados con raciones que contenían hasta un 15% de pulpa de café ensilada con 5% de melaza tuvieron igual o mejor ganancia de peso total que aquellos alimentados con concentrado comercial. Con relación al consumo total de alimento no hubo diferencia entre el concentrado comercial y las raciones experimentales que contenían PCE. Se observó también que éstas dieron una mejor conversión alimenticia que el concentrado suministrado. Resultados similares se obtuvieron en experimentos de alimentación con híbridos de peces Cachama. El uso de cualquier tipo de PCE para complementar las raciones de pollos y ovejos no fué satisfactorio. Los conejos que se alimentaron con raciones que contenían cualquier tipo de PCE toleraron bien su presencia.

La pulpa de café que se obtiene del beneficio húmedo es sustancialmente diferente de la que se produce manualmente en el laboratorio. La diferencia se debe al lavado de azúcares, cafeína, fenoles y otros compuestos solubles en agua. No hace mucho tiempo se desarrolló una despulpadora cónica vertical (Penagos Hermanos & Co., Bucaramanga, Colombia) que no usa agua. La pulpa de café no lavada que se produce por este método de procesamiento seco es de esperarse que sea más rica en nutrientes y pudiera llegar a ser una materia prima de mejor calidad para el ensilaje. De todas maneras, se puede concluir que el ensilaje de la pulpa de café constituye una alternativa válida para manejar y almacenar las grandes cantidades de pulpa de café que se produce en las plantas beneficiadoras de cerezas de café alrededor del mundo. La inclusión de PCE en las dietas de algunos animales de la finca podría contribuir a disminuir los costos de producción de carne y leche, especialmente en los países en vías de desarrollo.

(Traducción al español del artículo "**Coffee Pulp is a by-product, not a waste**", publicado en *Tea and Coffee Trade Journal* **170**: 116, 118, 120, 122 & 123, 1998)

CARACTERIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA LAVAGEM E DESPOLPA DE FRUTOS DO CAFEEIRO E POSSIBILIDADES DE SEU USO NA FERTIRRIGAÇÃO

Matos, A.T.[1]; Pinto, A.B.[2]; Borges, J.D.[3]

[1]Prof. do Depto. de Eng. Agrícola/UFV, 36571-000, Viçosa-MG - [2]Mestranda em Eng. Agrícola, Depto. Eng. Agrícola/UFV - [3] Eng[a]. Agrícola, Depto. Eng. Agrícola/UFV

1 - INTRODUÇÃO

A atividade de lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro, necessária para obtenção de redução do custo de secagem dos grãos e melhoria na qualidade de bebida, é geradora de grandes volumes de águas residuárias, ricas em material orgânico em suspensão e constituintes orgânicos e inorgânicos em solução, de grande poder poluente.

A legislação ambiental do Estado de Minas Gerais (Deliberação Normativa COPAM no. 10/86) estabelece que, para o lançamento de águas residuárias em corpos hídricos, a demanda mg bioquímica de oxigênio (DBO_5, 20°C) seja de 60 L^{-1} ou a eficiência do sistema de tratamento para remoção da DBO seja superior a 85% (Von Sperling, 1995).

Trabalhos recentes indicam que a disposição de águas residuárias no solo podem proporcionar aumento da produtividade, melhorar a qualidade dos produtos colhidos, promover melhorias em algumas propriedades físicas dos solos (Matos et. al., 1996), além de reduzir a poluição ambiental (Matos et al. 1997). Entretanto, a aplicação de águas residuárias no solo, como forma de tratamento ou destinação final de efluentes, deve ser feita de forma criteriosa para que não venha a causar prejuízos ao solo, contaminação de águas subterrâneas e superficiais (Matos e Sediyama, 1996). Tendo em vista os problemas expostos, tornou-se objetivo deste trabalho a caracterização das águas residuárias da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro, avaliando-se o seu possível aproveitamento na fertirrigação de culturas agrícolas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Para caracterização da água residuária gerada na lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro, na sua forma bruta e após tratamento primário, foi escolhida uma propriedade agrícola, nas proximidades de Viçosa-MG, onde se processa, sazonalmente, este produto agrícola.

O sistema de tratamento das águas residuárias instalado é constituído de pré-tratamento com gradeamento simples e, posterior, lançamento do efluente em duas lagoas anaeróbias de contenção, dispostas em série, sendo a primeira de 50mx20mx3m e a segunda de 35mx20mx3m. Este sistema foi utilizado no tratamento da água residuária gerada no processamento da safra 98.

Em razão da coleta das amostras ter sido feita após o período de processamento do fruto, por ocasião da coleta das amostras, já não havia água residuária bruta para análise. Por esta razão, a água residuária bruta foi produzida em laboratório, conforme descrito a seguir.

Por ser o consumo de água na despolpadora de 4.000 L por tonelada de grãos processada, em laboratório, foi mantida a mesma proporção, misturando-se 1 kg de café em coco para cada 4 litros de água. Repetiu-se processo semelhante ao que foram submetidos os frutos para a lavagem e despolpa processados mecanicamente, ou seja, os frutos ficaram imersos em água por um dia e, posteriormente, foram atritados com as mãos até que a casca e parte da mucelagem se soltasse dos grãos. Os grãos e as cascas foram separados do líquido com uma peneira de malha fina. Do líquido destituído de material sólido grosseiro foi retirada uma amostra de 1,6 litros à qual deu-se o nome de A1. Volumes de 1,6 litros das águas residuárias da primeira (A2) e segunda (A3) lagoas foram coletados a 20 cm de profundidade e levados ao laboratório para, juntamente com a amostra A1, serem submetidas, seguindo-se metodologia da APHA (1995), às seguintes análises: sólidos sedimentáveis (SP), sólidos totais (ST), condutividade elétrica (CE), pH, nitrogênio total (N), fósforo total (P), potássio total (K), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A grande diferença observada entre o valor de SP encontrado nas amostra A1 em relação às amostras A2 e A3 deve-se à decantação do material grosseiro e a conseqüente formação de lodo nas lagoas anaeróbias. Pelo mesmo motivo, foram encontradas grandes diferenças nos valores de ST.

Os valores de pH, levemente ácido na água residuária bruta, elevou-se nas lagoas anaeróbias.

Verificou-se, menor concentração de K, DQO e DBO, na amostra A2 do que na A3. Acredita-se que a lavagem do maquinário e do pátio, após o término do período de processamento da safra anual, proporcionou a diluição da água residuária armazenada na primeira lagoa, o que pode ter proporcionado diminuição da concentração desses parâmetros.

No que refere-se à condutividade elétrica, os valores encontrados indicam que o grau de restrição para uso das águas em irrigação, segundo Ayers & Westcot (1991), é considerado severo para a água A1 e ligeiro a moderado para A2 e A3. Esses resultados indicam que o uso, principalmente da água bruta, para suprimento das necessidades hídricas da cultura, por exemplo do café, que segundo Bernardo (1995) é da rdem de 1200 mm $há^{-1}$ ano^{-1} ou 12.000 m^3 ha^{-1} ano^{-1}, deve ser evitado, sob risco de se proporcionar a salinização do solo.

Tomando-se por base as recomendações de adubação nitrogenada e potássica para a cultura do café que, de acordo com Malavolta e Kliemann (1985), é de 200 kg $há^{-1}$ ano^{-1} de N e de K_2O, os volumes de água residuária bruta da lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro deve ser, respectivamente, de 432 m^3 $há^{-1}$ ano^{-1} e 138 m^3 $há^{-1}$ ano^{-1}. Para a fertirrigação utilizando água da lagoa 1, podem ser usadas, respectivamente, 4.454 m^3 $há^{-1}$ ano^{-1} e 1.300 m^3 $há^{-1}$ ano^{-1} e, no caso de uso de água da lagoa 2, de 5.267 m^3 $há^{-1}$ ano^{-1} e 746 m^3 $há^{-1}$ ano^{-1}. Maiores taxas de aplicação só seriam recomendáveis no caso de monitoramento químico do solo, com o intuito de evitar danos a ele e à cultura explorada.

Quadro 1 - Parâmetros de qualidade da água residuária proveniente da lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro.

mostr	pH	CE	SP	ST	N	P	K	DQO	DBO
		dS m^{-1}	mL L^{-1}	g L^{-1}	-------- mg L^{-1} -----				
1	6.4	4.863	88,0	10.6	462.6	15	1.206	7.999	5.859
A2	7.1	0.985	2.0	0.8	44,9	0.6	154	147	69
A3	7.1	1,186	1,9	1.0	38.0	ND	268	539	410

A1 - água residuária bruta; A2 - primeira lagoa anaeróbia; A3 - segunda lagoa anaeróbia.ND - parâmetro não detectado.

4 - CONCLUSÃO

As águas residuárias da lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro, em razão da elevada DBO que apresentam, se lançadas em cursos d'água, sem tratamento prévio, devem causar poluição de grande impacto ambiental.

O tratamento primário em lagoas anaeróbias mostrou-se eficiente na redução de todos os parâmetros, à exceção do pH, avaliados; as águas residuárias da lavagem e despolpa de frutos do cafeeiro, por serem constituídas de muitos nutrientes de interesse agrícola, podem ser aproveitadas na fertirrigação de lavouras, entretanto, o potássio, por ser o nutriente presente em maior concentração na água residuária, deve ser utilizado como referencial para o cálculo da sua taxa de aplicação no solo.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA 1995. Standards methods for the examination or water and wastewater APHA, AWWA and WPCR. 19ª ed., New York.

Ayers, R.S.; D.W. Westcot. 1991. A qualidade da água na agricultura. Capina Grande, UFPB. 218 p. (Estudos FAO: Irrigação e Drenagem, 29)

Bernardo, S. 1995. Manual de irrigação. 657 p.

Malavolta, E.E.; H.J. Kliemann. 1985. Desordens nutricionais no cerrado. Piracicaba, SP.

Matos, A.T. e M.A.N. Sediyama. 1996. Riscos potenciais ao ambiente pela aplicação de dejeto líquido de suínos ou compostos orgânicos no solo. In: Freitas, R.T.F. e Viana, C.F.A. 1 Seminário mineiro sobre manejo e utilização de dejetos de suínos. EPAMIG,EMATER,UFV,ASSUVAP. p.45-54.

Matos, A.T. e M.A.N. Sediyama, S.M. Vidigal. 1996. Características químicas, físicas e microbiológicas do solo influenciadas pela aplicação de compostos orgânicos ou dejeto líquido de suínos. In: Freitas, R.T.F. e Viana, C.F.A. 1 Seminário mineiro sobre manejo e utilização de dejetos de suínos. EPAMIG,EMATER,UFV,ASSUVAP. p.35-44.

Matos, A.T., M.A.N. Sediyama, S. P. Freitas, S.M. Vidigal, N.C.P. Garcia. 1997. Características químicas e microbiológicas dos solo influenciadas pela aplicação de dejeto líquido de suínos. Revista Ceres, 44(254): 399-410.

Von Sperling, M.; Costa, A. L. M.; Castro, A.A. 1995. Esgotos sanitários. In: Barros, R.T. V.; Chernicharo, C.A.L.; Heller, L.; von Sperling, M. Manual de Saneamento e proteção ambiental para os municípios. DESA/UFMG. p. 113-160.

SELECTION OF STRAINS OF *Volvariella volvacea* AND CHARACTERISTICS ON THE EXTRACT OF COFFEE HUSK

Fan Leifa, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol and R. Mohan

Laboratorio de Processos Biotecnologicos, Departamento de Engenharia Quimica, Universidade Federal do Parana, CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil

INTRODUCTION

Coffee production is an economically important agro-industry in more than fifty countries (ICO, 1998). While most of the industries adopts the wet processing method (ICO, 1998), in Brazil majority of the industries use dry-method and only about 10% of production comes from that method (SOCCOL, 1995). The wet method generates a great volume of liquid, causing environmental problems and resulting in loss of organic substance with a lot of sugar and pectin (SOCCOL, 1996).

Volvariella volvacea is an edible mushroom, growing in the tropical and subtropical regions at the temperature of 25-40 °C (SHAFFER, 1957; REYNOLDS, 1967). This mushroom is a good source of protein, generally containing 20-40% of protein (dry) (CHANG e MILES, 1984; Yang, 1986). Mushroom mycelium, like the sporophore, is a good source of amino acids and B-vitamins (Block, 1953). Since first producing of mushroom mycelium (HUMFELD, 1948), many works have been developed to explore the utilities of mycelium or produce enzymes , antibiotics and anticancer agents due to its rapid propagation (RAMOS, 1967).
The works of *V. bakeri* and *V. bombicina* on the coffee pulp were undertaken (MARTINEZ, 1984; THIELKE, 1989), but no works have been found on the liquid residue of coffee processing by using *V. volvacea*. This work aims to is to select suitable strain of this fungus for the use of coffee husk which is also in great volume in Brazil and cultivate this fungus as an aliment. The other objective is to determine some parameters of growth of this fungus in the utilisation of the residue for later exploitation of the fungus mycelium.

MATERIALS AND METHODS

Micro-organism. *V. volvacea* LPB 59, 11, 23, 09, 62, routinely maintained at ambient temperature on PDA, were used for selection of strain in this experiment. Those strains were transferred from tubes to petri-plates before the experiments.

Medium preparation. The 40g of dry coffee husk was used for preparing 1 litre the solution of the extract through one hour cocking. After the filtration, pH of the liquid was adjusted to 7,0 ,then added with the
Agar. After autoclave, the medium of about 15 ml was distributed to the each petri-plate (10 cm). The inoculation was made with a disk of 5 mm in diameter (Soccol, 1994). Incubation was undertaken in the dark at 32 °C.

Evaluation of growth. From the third day beginning measure the growing of mycelium till the mycelium firstly reached the margins of the plate. Then weighing the biomass through the dissolving the medium, filtrating and drying (Soccol, 1994).

pH and temperature test. The medium preparation and evaluation of growing of the mycelia was undertaken in the same way as the above. pH was effected at 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 after the autoclave. Temperature was adopted at 8 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C, 32 °C, 36 °C.

Nitrogen supplements and soybean flour The basic medium was prepared in the same way above. The source of nitrogen was $NaNO_3$, soybean flour, $(NH_4)_2HPO_4$, yeast extract, peptone at the concentration of 2 g/L. The concentration of soybean flour was used at 2, 4, 6, 8, 10 g/L respectively.

RESULTS

Selection Of Strain Of *V. Volvacea* In The Extract Of Coffee Husk.
The Figure 1 shows the colony characteristics of the different strains of *V. volvacea* in this experiment. It was observed that the strain *V. volvacea* LPB 09 is the best with more white and density of mycelia in this medium, the radial mycelial velocity being 15,34 mm/day and biomass 35,29 mg/plate in 5 days at 32 °C. So the strain *V. volvacea* LPB 09 was selected out for the further studies.

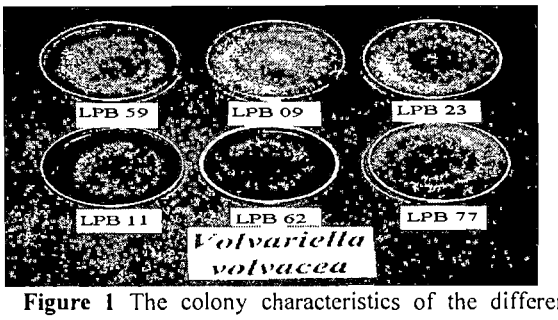


Figure 1 The colony characteristics of the different strains of *V. volvacea*

EFFECT OF pH ON THE GROWTH OF MYCELIA OF *V. volvacea* LPB 09 IN THE MEDIUM OF EXTRACT OF COFFEE HUSK

The Figure 2 shows that the optimum pH is between 6,0-8,0 when the mycelia grows at 16,75-17,72 mm/day and biomass was produced to 38,45-39,78 mg/plate during the 5 days at 32 °C.

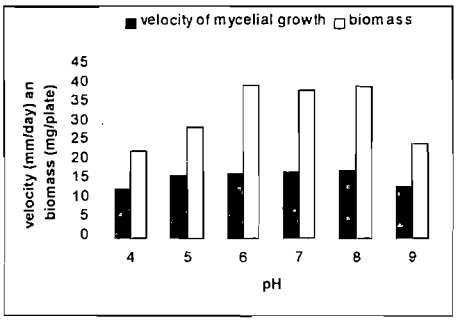


Figure 2 Effect of pH on the mycelial growth of *V. volvacea* LPB 09 in the extract of coffee husk

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE GROWTH OF MYCELIA OF *V. volvacea* LPB 09 IN THE MEDIUM OF EXTRACT OF COFFEE HUSK

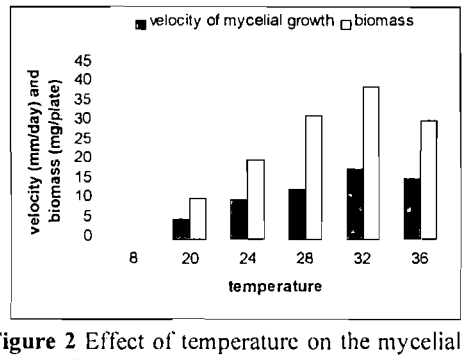


Figure 2 Effect of temperature on the mycelial growth of *V. volvacea* LPB 09 in the extract of coffee husk.

The data shows that the optimum temperature is 32 °C when the mycelia grows at 17,90 mm/day and biomass was produced to 39,34 mg/plate during the 5 days at 32 °C.

EFFECT OF GLUCOSE ON THE GROWTH OF MYCELIA OF *V. volvacea* LPB 09 IN THE MEDIUM OF EXTRACT OF COFFEE HUSK

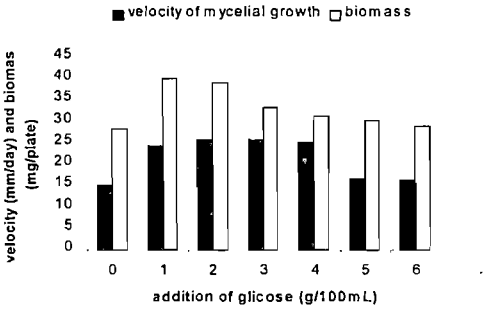


Figure 3 Effect of glucose on the mycelial growth of *V. volvacea* LPB 09 in the extract of coffee husk

The data shows that addition of glucose at the 1-2 g/100mL is better than CK in the velocity of mycelial growth and biomass. But the concentration of glucose over 3 g/100mL inhibited the growth. The velocity and biomass were 24,53-25,70 mm/day and 39,32-40,12 mg/plate when the addition of glucose was at the 1-2 g/100mL.

EFFECT OF NITROGEN SOURCE ON THE GROWTH OF MYCELIA OF *V. volvacea* LPB 09 IN THE MEDIUM OF EXTRACT OF COFFEE HUSK

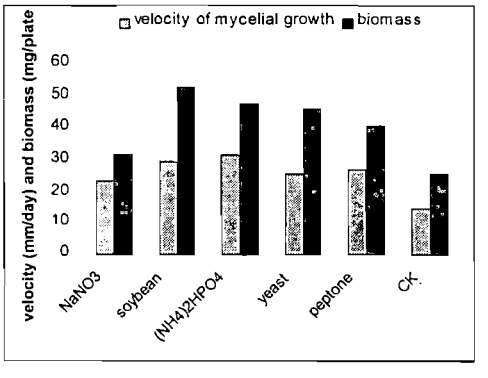


Figure 3 Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *V. volvacea* LPB 09 in the extract of coffee husk

The data shows that the soybean flour is better than others nitrogen sources and CK on the growth of mycelia of *V.volvacea* LPB 09 during 4 days with the velocity of 29,73 mm/day and biomass of 53,02 mg/plate.

EFFECT OF ADDITION OF SOYBEAN FLOUR ON THE GROWTH OF MYCELIA OF *V. volvacea* LPB 09 IN THE MEDIUM OF EXTRACT OF COFFEE HUSK

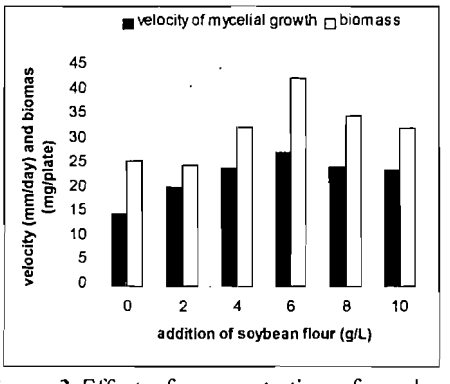


Figure 3 Effect of concentration of soybean on the mycelial growth of *V. volvacea* LPB 09 in the extract of coffee husk

The data shows that the addition of soybean flour was a positive effect on the fungal growth until 8 g/L. It gained the radial growing velocity of 27,56 mm/day and biomass of 42,74 mg/plate at the addition of soybean flour of 6 g/L during 4 days at 32 °C.

DISCUSSION

The studies above have demonstrated that the extract of coffee husk from the dry-method processing of coffee industries serve as a good basic medium for *V.volvacea*, so that it is conduced that the liquid residue of wet processing method might also be used as a medium for this fungus. The optimisation of some parameters for the mycelial growth of this fungus on the extract of coffee husk was in agreement with the studies (Fan, 1986).

Through the analysis of the extract of coffee husk, we found that the majority of caffeine and tannins in the coffee husk was removed into the extract after cooking. Initially, the mycelium grows slower util some replication of adaptation when the mycelium grows more rapidly. As for the degradation of caffeine and tannins, some works will be undertaken later.

REFERENCES

Block, S. S. Mushroom mycelium in experiments with submerged culture Jour. Agr. Food Chem. USA.

Chang, S.T. and Miles, P.G. 1984 A new look at cultivated mushroom Bioscience, USA.

Chang, S.T. 1989 Edible mushroom and their cultivation CRC Press, Inc., Florida.

Fan, L.F. and Fang, J.L. 1986 Selection of strains and cultural techniques of Volvariella volvacea Zhejiang Edible fungi. Zhejiang, China.

International Coffee Organization 1998 Total production of exporting members http://www.ico.org/proddoc.htm

Humfeld, H. 1948 The production of mushroom mycelium in submerged culture Science.

Martinez, D. and Quirarte, M. 1984 Prospects of growing edible mushroom on agro-industrial residues in Mexico Boletin de la sociedad Mexicana de micologia, Mexico.

Ramos, M. A. 1967 A study on submerged culture production of V. volvacea mucelium as a souce of protein, B-vitaminas and food flavor. The Philippine Journal of Science.

Soccol, C.R. 1994 Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhyzopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus* Tese de Livre-Docência. UFPR,Curitiba,1994. 228p.

Soccol, C.R. 1995 Aplicações da fermentação no estado sólido na valorização deresíduos agroindustriais. França-Flash Agricultura.

Soccol, C.R 1996 Aplicaciones Agroindustriales de los Processos de Fermentciones em Medios Solidos. Biotechnologia y Bioingeneria. Sociedade Mexicana de Biotechnologia y Bioengeneria, Mexico.

Thiclke, C. 1989 Cultivation of edible fungi on coffee grounds Mushroom Science XII (parte II) Germany.

Yang, X. M. 1986 Cultivation of edible mushroom in China Agriculture printing house, Beijing, China.

DETOXIFICAÇÃO BIOLÓGICA DA CASCA DE CAFÉ POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Debora Brand[1], Fernando Kawata[1], Ashok Pandey[1], Sevastianos Roussos[2], Maria Carolina Rocha dos Santos[1], e Carlos Ricardo. Soccol[1]

[1]Laboratorio de Processos Biotecnologicos, Departamento de Engenharia Química.
Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-970 Curitiba-PR, Brazil
[2]Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 132288 Marseille, France.

INTRODUÇÃO

A transformação tecnológica do café, gera uma grande quantidade de resíduos não aproveitados como: cascas, folhas e borra, que podem ser utilizados como substrato de fermentação por seu grande conteúdo nutricional. A casca de café apresenta um baixo valor nutricional, devido a presença de substâncias tóxicas como cafeína (1,2 %), taninos (6,3%) e polifenóis. Uma alternativa para melhorar este conteúdo é a utilização da fermentação no estado sólido, empregando microorganismos capazes de utilizar a cafeína como fonte de nitrogênio. A fermentação no estado sólido é considerada a mais natural das fermentações, porque seus processos assemelham-se as condições sob as quais a maioria dos microrganismos crescem na natureza. É definida como o crescimento de microorganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, mas o substrato deve conter umidade suficiente, presente na forma absorvida dentro da matriz sólida.
O objetivo do presente trabalho foi incrementar o valor biológico da casca de café, pela detoxificação de seus componentes tóxicos por fungos filamentosos, utilizando a técnica de fermentação no estado sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de Microorganismos

Os microorganismos foram selecionados com base na sua velocidade de crescimento radial e biomassa produzida em ágar extrato de casca de café (100g/L) Foram utilizadas onze cepas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e duas do gênero *Phanerochaete*.
O crescimento radial em ágar extrato de casca de café foi realizado por meio de inoculação dos microorganismos estudados no centro de uma placa de Petri. A biomassa foi medida através da dissolução do ágar e separação da biomassa, que foi então pesada em um papel de filtro previamente tarado.

Preparo do Ágar extrato de casca de café

Pesou-se 100 g de casca de café previamente pulverizada com partículas inferiores à 0,8 mm e adicionou-se 1000 mL de água destilada em um frasco Erlenmeyer de 2000 mL. Cozinhou-se em autoclave à 100° C, durante 1 hora. Filtrou-se e completou-se o volume para 1000 mL.
Adicionou-se então 20 g/L de ágar bacteriológico. Esterilizou-se o meio em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Preparo do substrato

A casca de café inicialmente foi seca em estufa com circulação de ar à 55° C por 48 horas até atingir uma umidade de aproximadamente 8 %. O substrato foi conduzido a um processo de moagem em moinho manual e posteriormente foi realizada uma classificação do material por meio de peneiras. Utilizou-se a fração granulométrica compreendida entre 0,8 e 2,0 mm.
Pesou-se 20 g da casca de café previamente moída, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 50 % de água à partir da umidade calculada e procedeu-se a esterilização do material. As fermentações foram feitas em duplicata, variando-se as condições iniciais de pH e umidade para cada experimento.

Preparo do inóculo

Phanerochete chrysosporium: O fungo foi inoculado em placas com meio PDA (ágar batata dextrose), que foi então incubado em estufa a 35° C durante 10 dias. Os esporos foram coletados em Câmara de Fluxo Laminar com o auxílio de uma alça de platina e transferidos para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo água destilada e gotas de tween 80 que foram previamente esterilizados. Faz-se então a contagem do número de esporos em câmara de Neubauer.
Rhizopus arrhizus: Utilizou-se a mesma técnica descrita acima, sendo que a temperatura de incubação é de 32° C.

Análises das Amostras Fermentadas

O grau de detoxificação das amostras foi avaliado pela quantificação de cafeína e taninos remanescentes na casca após fermentação:

Cafeína: método que envolve a digestão da amostra com ácido sulfúrico e extração com clorofórmio e comparação com a curva padrão em espectrofotômetro no comprimento de onda de 276,5 nm.

Taninos: O teor de taninos foi determinado pelo método de Lowenthal, que consiste na titulação da amostra com permanganato de potássio com indicador de índigo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do crescimento radial e biomassa produzida para fungos do gênero *Rhizopus* estão demonstrados na tabela 1:

TABELA 1: Seleção de cepas de *Rhizopus* em ágar extrato de Casca de Café (100 g/L)

CEPA	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO RADIAL (MM/H)	BIOMASSA (mg/placa)
R. oryzae 28168	2,19 ± 1,12	10,20 ± 0,56
R. oryzae 395	2,05 ± 0,87	8,70 ± 1,20
R. delemar 34612	2,13 ± 2.12	10,80 ± 6,00
R. circicans 1475	2,09 ± 0,83	9,20 ± 0,70
R. arrhizus 16179	2,03 ± 0,34	12,10 ± 2,20
R. arrhizus 28425	1,94 ± 0,76	6,6 ± 0,40
R.oryzae 28627	1,88 ± 1,15	7,90 ± 4,30
R. sp. 25975	1,78 ± 1,32	2,80 ± 0,20
R. oligosporus 3267	1,78 ± 0,87	3,60 ± 0,20
R. arrhizus 2582	1,45 ± 0,97	3,20 ± 0,20
R. formosa 28422	0,94 ± 0,65	2,90 ± 0,80

*TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 32 C. PH INICIAL: 6,0

OBSERVA-SE PELOS VALORES DEMONSTRADOS NA TABELA ANTERIOR, QUE AS VELOCIDADES DE CRESCIMENTO DE CADA CEPA, VARIARAM ENTRE 0,94 MM/H À 2,19 MM/H. AS CEPAS DE *RHIZOPUS* QUE PRODUZIRAM MAIOR QUANTIDADE DE BIOMASSA CORRESPONDEM ÀQUELAS QUE TEM MAIOR VELOCIDADE DE CRESCIMENTO. VERIFICA-SE QUE AS CEPAS FORAM CAPAZES DE ASSIMILAR E METABOLIZAR O SUBSTRATO À BASE DE CASCA DE CAFÉ PRODUZINDO BIOMASSA, QUE É CARACTERIZADO PELO CRESCIMENTO RADIAL. PARA ESTUDOS POSTERIORES DE FERMENTAÇÃO FOI ESCOLHIDA A CEPA *RHIZOPUS ARRHIZUS* 16179 POR TER APRESENTADO A MAIOR PRODUÇÃO DE BIOMASSA E UMA DAS MELHORES VELOCIDADES DE CRESCIMENTO.

Na seleção de cepas de fungos do gênero *Phanerochaete,* foi avaliada a velocidade de crescimento radial e a biomassa produzida de duas cepas denominadas de HD e BK, demonstradas na tabela 2:

TABELA 2: Seleção de cepas de *Phanerochaete* em ágar extrato de casca de café

CEPA	Velocidade de crescimento radial (mm/hora)	Biomassa (mg/placa)
P.chrysosporium HD	1,56 ± 0,34	1,83 ± 0,56
P.chrysosporium BK	2,03 ±0,82	2,21 ± 0,76

*Temperatura de incubação de 37°C, pH inicial: 4,5

Para estudos de fermentação foi escolhida a cepa BK por apresentar uma maior velocidade de crescimento radial e biomassa produzida em 92 horas.

Fermentação no Estado Sólido

Para as fermentações realizadas com a cepa *Rhizopus arrhizus* 16179 foi testado pH inicial entre 5,5 e 6,5 e umidade de 60 à 70%, pode-se observar pelo gráfico 1 que a maior detoxificação ocorreu em pH 6,0, umidade de 60 % a 32°C, demonstrado no experimento 5. O tempo de fermentação foi de 6 dias para todos os experimentos.

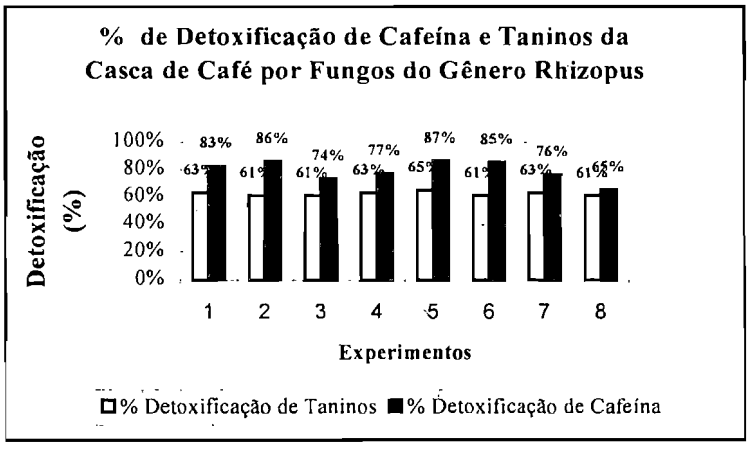


Gráfico 1. Detoxicação da casca de caf por *Rhizozopus* 16179 Com um tempo d fermentação de 14 dias o fung *Phanerochaete chysporium* foi capaz d degradar a cafeína e 45% de taninos num pH inicial de 5,5 , umidade de 65% à 35°C como demonstrado no experimento 5 d gráfico 2. Nos 4,5 à 5,5 e a umidade de 6 à 70%.

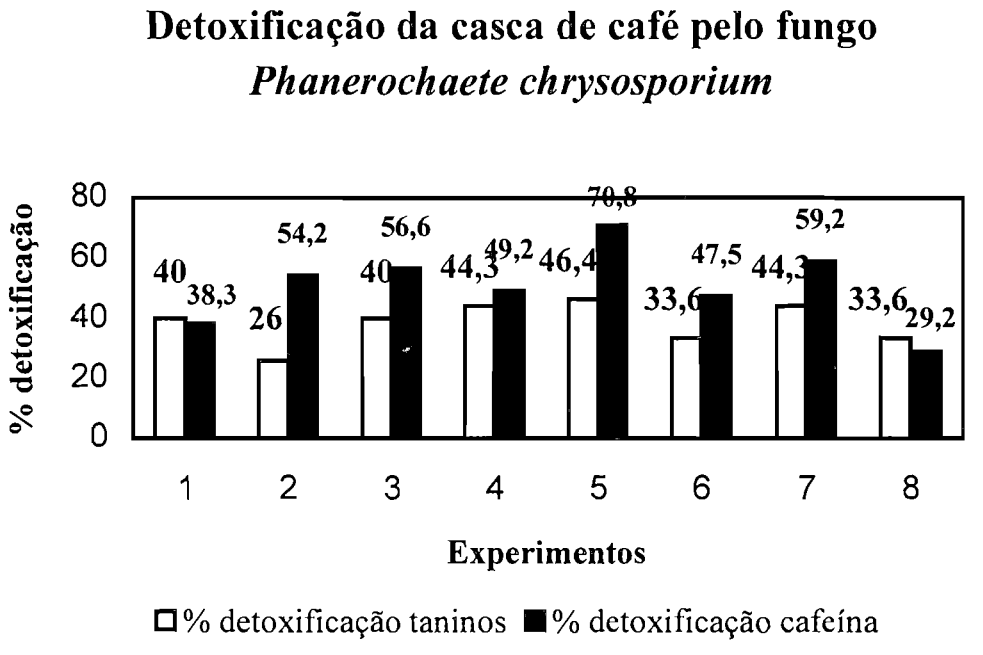


Gráfico 2: Detoxificação da casca de café por *Phanerochaete BK.*

CONCLUSÃO

As cepas selecionadas são capazes de degradar parcialmente os compostos tóxicos presentes na casca de café. Os testes deste estudo foram realizados sem a adição de nutrientes às cascas de café, o que significa que os microorganismos podem utilizar somente os componentes presentes no substrato para biotransformá-lo. Um grau de detoxificação de cafeína de aproximadamente 90 %, deixa apenas 0,2 % de cafeína no material o que já o torna apto para utilização como ração animal. Este estudo demonstra as potencialidades do uso das cepas selecionadas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* e *Phanerochaete* para detoxificação da casca de café com vistas a seu uso na alimentação animal.

AGRADECIMENTO

Carlos Ricardo Soccol agradece ao CNPq (bolsa produtividade em pesquisa) e a União Européia (projeto INCO DC: N CT970185) pelo apoio financeiro recebido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GAIME PERRAUD, I. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. These de Doctoract – Université Montpellier II, France, 1996. 210p.

HESSELTINE, C.W.. Solid State Fermentation - An overview. International_biodeterioration, v.23, p. 79-89,1987.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas doInstituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1985. 523 p.

PANDEY, A.. Recent Process Developments in Solid-StateFermentation. Process Biochemistry, v. 27, n. 2, p. 109- 117, 1992.

ROUSSOS, S.; HANNIBAL, L.; AQUIAHUATL, M.A.; TREJO HERNANDEZ, M.R.; MARAKIS, S. Caffeinedegradation by *Penicillium verrucosum* in Solid State Fermentation of Coffee Pulp: Critical Effect of Additional Inorganic and Organic Nitrogen Sources. Journal of Food Science Technology. Vol. 31, No. 4, 316- 319, 1994.

SOCCOL, C. R. . Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado sólido em Relação a produção de Ácido Fumárico, Biotransformação de Resíduo Sólido de Mandioca por *Rhizopus* e basidiomacromicetos do Gênero *Pleurotus*. Tese para o Concurso Público de Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos - Curitiba, 1994, 228p.

CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE GA_3 POR FERMENTAÇÃO

Cristina M. M. Machado,[1] Carlos R. Soccol[1], Brás H. Oliveira,[2] Carlos Oliveira[1], Ashok Pandey[1]

[1]Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), CEP 81531-970 Curitiba-PR, Brazil;
[2]Laboratório de Produtos Naturais

INTRODUÇÃO

Ácido giberélico (GA_3) é um hormônio endógeno de plantas superiores e metabólito secundário de certos fungos. É um importante promotor e regulador do crescimento das plantas sendo utilizado na agricultura, viveiros, produção de flores, etc., para uma série de efeitos benéficos, como eliminação da dormência e aceleração de germinação em sementes, melhora no rendimento das colheitas, promoção da formação do fruto, indução do florescimento e outras. Nos últimos anos, este metabólito tem sido produzido industrialmente por fermentação submersa a um alto custo (US$ 1 a 3/grama, dependendo da pureza e potência), uma vez que o rendimento é muito baixo e sua extração difícil. A redução do mesmo levará suas diversas aplicações a uma utilização mais extensa, trazendo ótimos benefícios econômicas à agricultura e indústria. Uma possibilidade de diminuição dos custos está na pesquisa de novas técnicas de fermentação (Kumar e Lonsane, 1987, 1989; Brückner e Blechschmidt, 1991).

Recentemente, tem aumentado o interesse de cientistas no desenvolvimento de produção de giberelinas por fermentação em estado sólido (FES). Fermentação sobre farelo de trigo é descrita por Kumar e Lonsane (1987), que compararam o rendimento com a técnica submersa. Tal comparação também foi feita por Tomasini *et al.* (1997), utilizando-se como substratos farinha de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e poliuretano de baixa densidade. Ambos grupos obtiveram maior rendimento com a FES, no caso de Kumar e Lonsane de 1,6 vezes, e custo cerca de 2,5 vezes menor.

O termo fermentação no estado sólido (FES), tradução do inglês "solid state fermentation", é objeto de numerosas definições. Pandey (1992), define como a fermentação na qual o crescimento do microrganismo em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido na forma livre. A água livre indispensável ao crescimento dos microrganismo é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. A FES é considerada mais natural que outros tipos de fermentações, como, por exemplo, a fermentação submersa, porque seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismo crescem na natureza (Hesseltine, 1972). Diversos resíduos agrícolas ou agro-industriais, celulósicos ou amiláceos têm sido utilizados em fermentação no estado sólido, tais como bagaço de cana-de-açúcar, de mandioca e de maçã, batata refugo, palha de arroz (Soccol, 1994; Sturza, 1995; Ayala, 1996; Bramorski, 1997).

Durante o processamento do café, a polpa, a camada mucilaginosa e a casca são removidas. Estes resíduos representam cerca de 50% em massa do café. Apesar do grande volume de resíduos e alguns esforços isolados na utilização dos resíduos do café, a maior parte desta abundante fonte natural continua sendo disposta como resíduo (Molina, *et al.*, 1974; Brahan and Bressani, 1978).

Com este trabalho pretende-se determinar a possibilidade da utilização da casca do café como meio de cultivo para produção de ácido giberélico por fermentação. Para tanto foram utilizadas seis cepas de microrganismos produtores de GA_3 em fermentação no estado sólido e submersa, comparando-se dessa forma, o rendimento dos métodos.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e Substratos

Seis cepas de *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium moniliforme*, mantidas em ágar dextrose-batata (PDA) em tubos inclinados foram inoculadas em meio Czapek Dox em shaker rotatório a 30 °C por 4 dias para desenvolvimento da solução semente (Bandelier, *et al.*, 1996).

O meio para fermentação submersa foi feito a partir do cozimento de 200 g de substrato (casca de café) por uma hora em autoclave a 100° C e posterior filtragem do mesmo. O resíduo sólido, foi seco em estufa e também utilizado como substrato para FES. O filtrado teve seu pH ajustado e foi esterilizado. Os meios sólidos consistem na casca de café, e no resíduo da extração, em granulometria entre 0,8-2,0 mm, com pH e umidade ajustados para as condições determinadas da fermentação. Estes meios são então esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos.

Condições de fermentação

Para as fermentações submersas inoculou-se solução semente à 50 mL de meio líquido extrato de café, em frascos erlenmeyer de 250 mL. Nas fermentações em estado sólido inoculou-se solução semente à 10 g de meio sólido casca de café, ou resíduo café em frascos erlenmeyer de 250 mL.

Após a fermentação, os meios foram extraídos com acetato de etila a pH 2,5. A seguir, as amostras analisadas em cromatografia de camada delgada (TLC) para confirmação da presença de GA_3 . Uma vez confirmada a presença do mesmo, as amostras que apresentaram melhor fluorescência foram purificadas e analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As fermentações foram levadas em condições iguais de temperatura, quantidade de meio, razão de inóculo e tempo de fermentação. Os procedimentos de extração e purificação das amostras também foram os mesmos, acima descritos, validando, desta forma, a comparação dos substratos.

As condições das fermentações são mostradas na Tabela 1 a seguir:

TABELA 1: Condições de fermentação

Condição	FSm	FES
Temperatura (° C)	29	29
pH inicial	4.5	4.5
Razão de inóculo	15% (V/V)	15% (V/m)
Umidade inicial (%)	-	60
Rotação (rpm)	220	-
Tempo (dias)	7 dias	7 dias

Análise do metabólito

Cromatografia de camada delgada (TLC)

FASE MÓVEL: clorofórmio, acetato de etila, ácido acético (40:60:5)

Preparação das amostras

Após a extração e evaporação da amostra, a mesma foi diluída em acetato de etila e hexano (1:2). A purificação deu-se por passagem em coluna com sílica empacotada em pipeta de Pasteur. A seguir, passou-se 2,5 mL de metanol na coluna reservando esta última fração para a análise. O volume foi evaporado e diluído em 10 mL de metanol para HPLC.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

SISTEMA: da marca Varian constituído de: bomba quaternária modelo 9012Q; detetor de fotodiodo modelo 9065 Polychrom; injetor automático Rainin modelo AI-200; estação de trabalho Star versão 4.5 e coluna cromatográfica C18 de 5 μm, 4,5X250 mm.

FASE MÓVEL: solução de metanol e água com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico. Volume de injeção de 30 μL e a detecção em UV em 205 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

Os resultados da produção de GA_3 por FES e FSm obtidos por TLC estão resumidos na Tabela 2:

TABELA 2: Resultados da presença de GA_3 produzido por fermentação em cromatografia em camada delgada

CEPA	FSm extrato de casca	FES casca de café	FES resíduo após extração
LPB-1	+++	++++	++++
LPB-2	++++	++	+++
LPB-3	++	+++	+++
LPB-4	+	+	++
LPB-5	+	+	++
LPB-6	++++	++++	+++++

Onde: Maior número de "+" significa melhor fluorescência.

Considerando-se que uma melhor fluorescência indica maior produção de GA_3, percebe-se pelos dados da Tabela 2 acima, que o melhor substrato foi o resíduo sólido da extração da casca do café. Isso se dá, provavelmente, por existirem substâncias inibidoras do metabolismo de produção das giberelinas nos resíduos de café (casca e extrato), que com o pré-tratamento (hidrólise) são eliminadas.

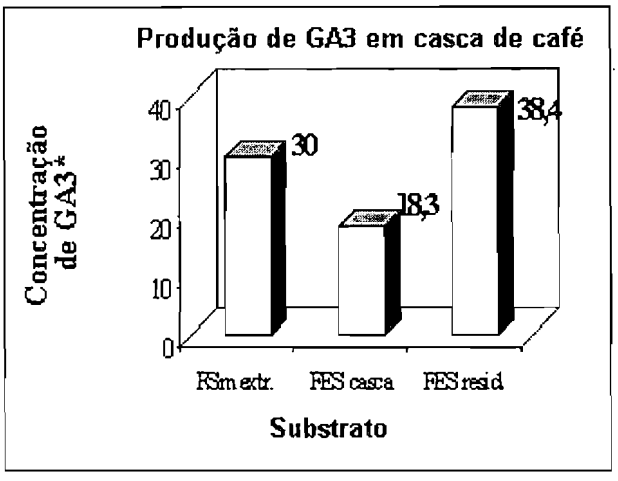
O microrganismo que apresentou melhor produção foi a cepa LPB-06, para os três sistemas de fermentação. Dessa forma, a quantificação por HPLC foi feita para os fermentados por este microrganismo. Para os sistemas em FES, a cepa LPB-01 e LPB-03

também apresentaram bons resultados; já para FSm, a cepa LPB-02 teve uma maior produção. As cepas LPB-04 e LPB-05 apresentaram uma baixa produção de GA_3 para todos os substratos.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os resultados da quantificação do GA_3 produzido por fermentação da cepa LPB-06, obtidos por HPLC estão apresentados na Figura 1, a seguir:

FIGURA 1: Produção de GA_3 pela cepa LPB-06, em diferentes sistemas de fermentação com casca de café.



*Os valores de concentração são dados em *mg GA_3/L* substrato para FSm e em *mg GA_3/kg* substrato para FES.

Com os resultados mostrados acima, percebe-se a possibilidade de utilização da casca de café como substrato para produção de GA_3 por fermentação no estado sólido, desde que feito um pré-tratamento do substrato.
Atualmente estão sendo otimizadas as condições de tratamento do substrato e de fermentação quanto a parâmetros físicos e nutricionais, utilizando-se planejamento experimental com análise por superfície de resposta. Com estas otimizações espera-se aumentar a produção de ácido giberélico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à CAPES e à União Européia (projeto INCO DC N ° CT 970185) pelo suporte financeiro recebido.

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

Ayala, L. Aproveitamento biotecnológico de batata refugos (Solanum tuberosum sp.) para produção de conídios do fungo entomopatogênico Beauveria bassiana (Bals) will para fermentação em estado sólido. Curitiba, 1996. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPr.

Bramorski, A. Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindústriais. Curitiba, 1997. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPr .

Brahan, J. E.; Bressani, R. Pulpa de Café – composición, tecnologia y utilización. Bogota: Instituto de Nutrición de Centro América y Panama, INCAP, 1978.

Brückne, B.; Blechschmidt, D. The Gibberellin Fermentation. Critical Rewiews in Biotechnology, 1991, 11(2), 163-192. utilizando-se planejamento experimental com análise por superfície de resposta. Com estas otimizações espera-se aumentar a produção de ácido giberélico.

esseltine, C. W. Solid State Fermentations. Biotechnology and Bioengineering, 1972, 14, 517-532.

Kumar, P. K. R. & Lonsane, B. K. Gibberellic Acid by solid state fermentation: consistent and improvement yields. Biotechnology and Bioengeneering, 1987, 30, 267-271.

Kumar, P. K. R. & Lonsane, B. K. Microbial Production of Gibberellins: state of the art. Advances in Applied Microbiology, 1989, 34, 29-139.

Pandey, A. Recents process development in solid state fermentation. Process Biochemistry, 1992, 7, 109-117.

Soccol, C. R.. Contribuição ao estudo de fermentação no estado sólido em relação à produção do ácido fumárico, biotransformaçào de resíduo sólido de mandioca por Rhyzopus e basidiomicetos do gênero Pleurotus. Curitiba, 1994. Tese (Professor titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) – UFPr.

Sturza, R. Aproveitamento biotecnológico dos resíduos da extração do suco da maçã por fermentação no estado sólido. Curitiba, 1995. Dissertação (MSc Tecnologia Química), UFPr .

Tomasini, A.; Fajardo, C.; Barrios-Gonzáles, J. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. Word Journal of Microbyology and Biotechnology, 1997,13, 203-206.

SCREENING OF FILAMENTOUS FUNGI FOR THE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR TANNASE IN SOLID-STATE FERMENTATION (SSF)

Van de Lagemaat, J[1]., Augur, C[2]., and Pyle, D.L[1]*.

[1]Biotechnology and Biochemical Engineering, Department of Food Science and Technology, The University of Reading, PO Box 226, Whiteknights, Reading, RG6 6AP, United Kingdom

[2]IRD, Institut de Recherche pour le Développement. IRD-Mexique, Ciceron 609, Los Morales, 11530 Mexico D.F. Mexico

*To whom correspondence should be addressed

ABSTRACT

Seven fungal strains (Aspergillus, Fusarium and Penicillium) were screened for the production of extracellular tannase in a solid-state fermentation system containing 1, 5 or 10 % (w/v) tannic acid. The majority of the strains produced more tannase in the 5 and 10 % (w/v) tannic acid fermentations compared to the 1 % (w/v) tannic acid fermentation. Penicillium frequentans showed the highest tannase activity (1.25 μmoles.min^{-1}.ml^{-1}) after 120 hours of fermentation in a 10 % (w/v) tannic acid fermentation while Fusarium moniliforme produced none or very small quantities of the enzyme. The tannase activities of the other strains depended very much on the concentration of tannic acid present in the fermentations. Zymograms showed 1-3 bands of activity for each of the different strains. Penicillium frequentans gave one distinct band and has been chosen for further studies.

INTRODUCTION

Tannin acyl hydrolase (E.C. 3.1.1.20), commonly called tannase, hydrolyses ester and depside bonds in hydrolysable tannins and gallic acid esters (Dykerhoff and Ambruster 1933) and is mainly produced by fungal strains belonging to the *Aspergillus* and *Penicillium* genera (Lekha and Lonsane 1997). It is claimed that tannase only acts on hydrolysable tannins and not on condensed tannins (Dykerhoff and Ambruster 1933). However, the hydrolysis of condensed tannins such as (-)epicatechin gallate and (-)epigallocatechin-3-galate has been reported (Lekha and Lonsane 1997).

Commercial tannase is currently produced by submerged fermentation (Okamura *et al.* 1987) and has found practical uses in the chemical, pharmaceutical and food industries. Studies suggest that fungal tannase production in solid-state fermentation (SSF) is advantageous over conventional submerged fermentation in terms of productivity, the extracellular nature and thermo- and pH stability of the enzyme (Lekha and Lonsane 1994).

Interest has occurred in tannase production by SSF with coffee pulp as a potential tannin-rich and cheap solid substrate. Data for the composition of tannins in coffee pulp are contradictory. Zuluaga (1981) reported the presence of 2 % total tannins in sun-dried coffee pulp from which 21 % were hydrolysable and 79 % were condensed tannins while Clifford and Ramirez-Martinez (1991) only found 1-2.7 % condensed tannins depending on the coffee species. Future studies are necessary to determine whether coffee pulp is a suitable substrate.

Little work has been done on the production of tannase in SSF by different fungal strains. An intensive screening to select a potent strain suitable for an SSF system is necessary since product titers in submerged fermentation are usually different from those in SSF (Shankaranand *et al.* 1992). Since tannic acid seems to be the best substrate for the enzyme (Yamada *et al.* 1968), a liquid medium containing this component was soaked in polyurethane foam (PUF) and was chosen as the initial SSF system in this study. In contrast to coffee pulp, PUF enables a controlled medium composition to be achieved, it offers monitoring of tannase formation, and separation of the enzyme from the inert carrier is easy.

MATERIALS AND METHODS

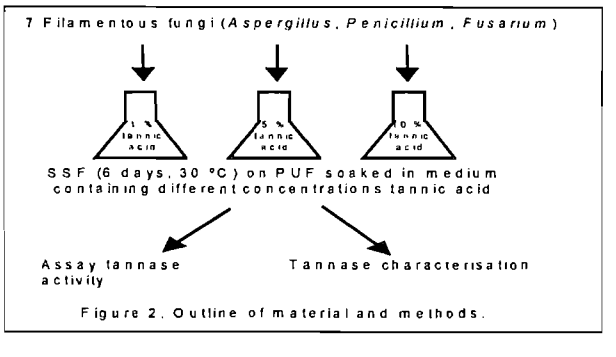


Figure 2. Outline of material and methods.

Liquid medium composition (w/v): 10, 5 or 1 % tannic acid, 1.0 % NH_4NO_3, 0.5 % KH_2PO_4, 0.25 % glucose, 0.1 % $MgSO_4.7H_2O$, 0.01 % $CaCl_2.2H_2O$, 0.002 % $MnCl_2.4H_2O$, 0.001 % $FeSO_4.7H_2O$, and 0.001 % $Na_2MoO_4.2H_2O$.

Determination of tannase activity: The quantity of gallic acid released during hydrolysis of tannic acid in the assay was measured after HPLC fractionation and determination of the area under the peak corresponding to gallic acid (Beverini and Metche 1990).

Characterisation of tannases: native gels were incubated with tannic acid and subsequently quinine that covered the gel with a white complex. Tannase activity was distinguishable because the enzyme in the gel hydrolysed the substrate into ucose and gallic Accid. acid which did not form a white complex with quinine (Aoki *et al.* 1979).

RESULTS AND DISCUSSION

Penicillium frequentans was the most productive strain in all three fermentations while *Fusarium moniliforme* was least productive in terms of tannase formation (Figure 3a-c). Also *Aspergillus phoenicis* showed an overall high enzyme activity. For the other strains, tannase productivity was very much dependent on the concentration of tannic acid present in the medium. 2-8 times more tannase was produced in the 5 and 10 % (w/v) tannic acid fermentation compared to the 1 % (w/v) tannic acid fermentation. Tannase activities for the 5 and 10 % (w/v) tannic acid fermentations did not differ as much.

Increase in activity can be explained by the fact that the fungus synthesises tannase which hydrolyses the tannic acid to soluble products as gallic acid and glucose. These end products enter into the cell by specific transport pathways and serve as the carbon and energy source for the may be caused by the lack of substrate in the medium or the secretion of toxic substances. The decrease in tannase activity might be due to the degradation of tannase by proteases but also gallic acid can inhibit the activity (Haslam *et al.* 1961).

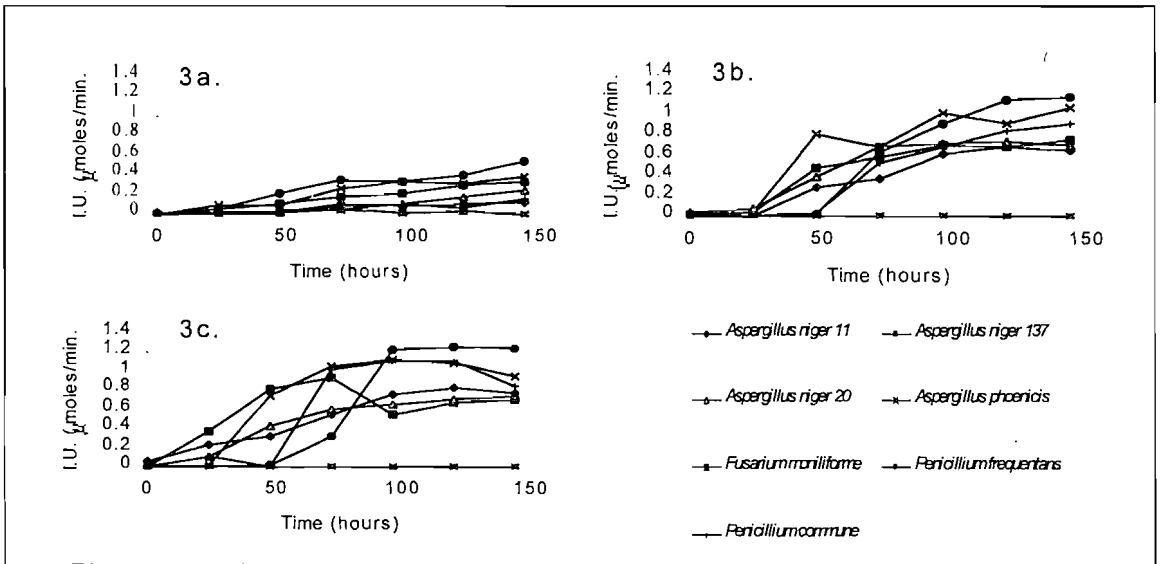


Figure 3a-c, Tannase activities for SSF containing 1 % (a), 5 % (b) and 10 %

Zymograms (Figure 4) showed that enzyme activity bands differed from strain to strain and that the number of bands varied as well. The fermentation extract from *Penicillium frequentans* showed one clear activity band while the extracts rom the other strains gave two or three distinct bands.

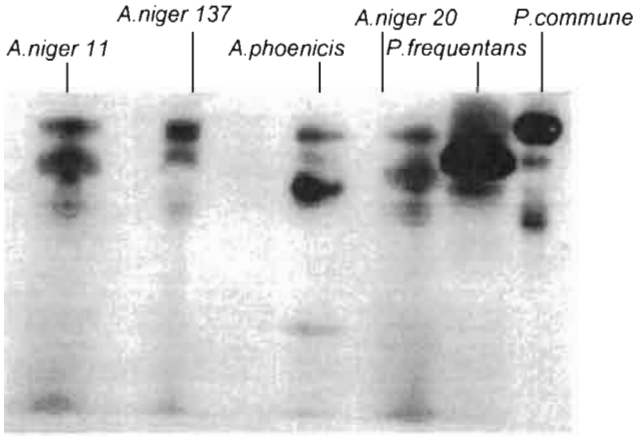


Figure 4, Activity gel with tannases from different fungal strains.

CONCLUSIONS

Penicillium frequentans produced the highest titers of extracellular tannase. The fermentation extract from this strain formed a single activity band in the enzyme characterisation studies which should facilitate purification. For those reasons *Penicillium frequentans* has been chosen for further studies on extracellular tannase production in SSF.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the European Union INCO-DC N° IC18*CT970185, BIOPULCA project.

REFERENCES

Aoki, K., T. Tanaka, R. Shinke, and H. Nishira. 1979. Detection of tannase in polyacrylamide gels. Journal of Chromatography 170: 446-448.

Beverini, M. and M. Metche. 1990. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus orizae*. Sciences des iments 10: 807-816.

Clifford, M.N. and J.R. Ramirez-Martinez. 1991. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. Food Chemistry 40: 191-200.

Dykerhoff, H. and R. Ambruster. 1933. Tannase. Z. Physiol. Chem. 292: 38-56.

Haslam, E., R.D. Haworth, K. Jones, and H.J. Rogers. 1961. Gallotannins. Introduction and the fractionation of the tannase. Journal of the Chemical Society 1829-1835.

lekha, P.K. and B.K. Lonsane. 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. Process Biochemistry 29: 497-503.

Lekha, P.K. and B.K. Lonsane. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. Advances in Applied Microbiology 44: 215-260.

Okamura, S., K. Mizusawa, K. Mamori, K. Takei, Y. Imai, and S. Ito. 1987. Fermentative manufacture of tannase. Japan patent 62 304 981.

Shankaranand, V.S., M.V. Ramesh, and B.K. Lonsane. 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. Process Biochemistry 27: 33-36.

Yamada, H., O. Adachi, M. Watanabe, and N. Sato. 1968. Studies on fungal tannase Part I: Formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*. Agricultural and Biological Chemistry 32: 1070-1078.

Zuluaga, J. 1981. Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café (Coffea arabica L.) The'se de Doctorat es Science. Université de Neuchatel, Suisse. 93p.

PRODUCTION OF FUNGAL TANNASE IN A MODEL SYSTEM BY SOLID STATE FERMENTATION

Cristóbal Noé Aguilar,[1] Christopher Augur,[2] Gustavo Viniegra-González[1] & Ernesto Favela-Torres[3]

[1]Biotechnology Dept. Universidad Autonoma Metropolitana. Iztapalapa Campus, Mexico, D.F.
[2]Institut de Recherche pour le Développement, IRD-Mexico.

Key words: *tannase, tannic acid, solid state fermentation.*

ABSTRACT

Coffee pulp is considered the most abundant waste and pollutant material produced by the coffee industry. Its utilization as animal feed is limited by presence of antiphysiological factors, such as polyphenolic compounds, among which, tannic acid present in high concentrations (3-4%). Thus, the use of tannase-producing fungal strains to degrade tannins might be an alternative to use coffee pulp as animal feed. In addition, tannase production from coffee pulp by solid state fermentation (SSF) might be an attractive possibility. The production of tannase by Aspergillus niger Aa-20 was evaluated. Several concentrations of tannic acid (12.5, 25, 50 and 100 g/L) were tested in a model system. Column reactors were packed with polyurethane foam impregnated with liquid medium and inoculated with spores. Tannase production was carried out for 48 h. Tannic acid uptake was measured by the phenol-sulfuric method and extracellular and intracellular tannase activities were assayed by HPLC-chromatography. Tannase activity increased with increasing concentration of tannic acid. Maximum extracellular and intracellular tannase activities (11.35 and 6.95 U/mL respectively) were recorded with 100 g/L of tannic acid. The substrate uptake was 100% at concentrations of 12.5, 25 and 50 g/L, while 73.03% was consumed in the presence of 100 g/L of tannic acid after 48 h of culture. These results suggest that high concentrations of tannins can be removed by SSF and tannase production can be reached in high titers.

INTRODUCTION

At present, coffee pulp is one of the most abundant wastes and agro-industrial pollutant generated by the coffee industry. The utilization of coffee pulp as animal feed has been investigated for several years (De Rozo *et al.*, 1985). However, its chemical composition is a great limiting factor due to the presence of antiphysiological factors, such as caffeine and polyphenolic compounds or tannins (Hakil *et al.*, 1998), among which, tannic acid, present in high concentrations (3-4%). Tannins are molecules considered as water-soluble phenolic compounds with molecular weights ranging from 500 to 3000. These are present in several plants where they act structurally as pigments or as protectors from the microbial attacks (Lekha and Lonsane, 1997). Several proposals to use the coffee pulp as product of added value have been made, among which, microbial enzyme production has been considered.

Fungal tannase production by SSF using coffee pulp as support might be an attractive possibility with two advantages, the removal *in situ* of hydrolizable tannins and enzyme production itself. Tannase catalyzes the hydrolysis of ester and depside bonds in such hydrolizable tannins as tannic acid. Tannase is also used in food and beverage processing (Coggon *et al.*, 1975).

A primary characterization of enzyme production is necessary in order to select better conditions for SSF process. In this work, tannase production and tannic acid degradation by *Aspergillus niger* Aa-20 was investigated in an SSF based model system. The effects of the tannic acid concentration on tannase production and its degradation were determined.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and culture medium

Spores of the *Aspergillus niger* Aa-20 strain (IRD-UAMI collection) used in this work were stored at -20°C in protect-crioblocks (bead storage system, Technical Service Consultants Limited). Inoculum was prepared by transfering the spores to PDA medium, incubated at 30°C for 5 days, and the spores were suspended into 0.01% Tween 80 solution and counted in a Neubauer chamber.Medium for tannase production was the same as reported by Lekha and Lonsane (1994)

using $(NH_4)_2SO_4$ as nitrogen source. Salt-containing medium was autoclaved at 121°C for 15 min. Tannic acid (Sigma, U.S.A.) solution was filter-sterilized and added to a final concentration of 12.5, 25.0, 50.0 and 100.0 g/L. The pH was adjusted to 5.5

Solid state fermentation (SSF)

The SSF involved the use of polyurethane foam (PUF) (Expomex, México) as a support to absorb the liquid medium. PUF was washed as reported by Zhu *et al.*, (1994) and then pulverized in a plastic-mill. Column reactors (25 x 180 mm) were packed with 10 g of inoculated material (2 x 10^7 spores/g of dry inert support). Culture conditions were: 30°C, aeration rate, 20 mL of air per gram of support per min, initial pH, 5.5 initial moisture content of 65% and an incubation time of 48 h with sample removal every 6 hours. For enzyme leaching, the content of each reactor was mixed with distilled water (10:1 w/v) and vortexed for 1 min. Solid particles were filtered (Whatman 41) and the clear filtrate was assayed for extracellular tannase activity. The remaining solids were washed three times with 50 mL of distilled water. Intracellular enzyme was recovered by freezing the cells in liquid nitrogen and by grinding in a chilled mortar. SSF system was conducted in triplicates and the average values reported are mean values.

Analytical methods

Tannase assay was carried out using the HPLC-methodology proposed by Beverini and Metche (1990). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme able to release 1 µmol gallic acid per mL per min.

Biomass formation in SSF was determined by measuring the protein concentration with Bradford-microassay following the technique reported by Córdova-López *et al.*, 1996.

Tannic acid concentration was evaluated spectrophotometrically (420 nm) using the phenol-sulfuric acid method.

An analysis of varience and t-test were used to evaluate all results obtained. Statistical analysis was made us ingIn Statfor Macintosh, version2.03 ,1994 Graphpad

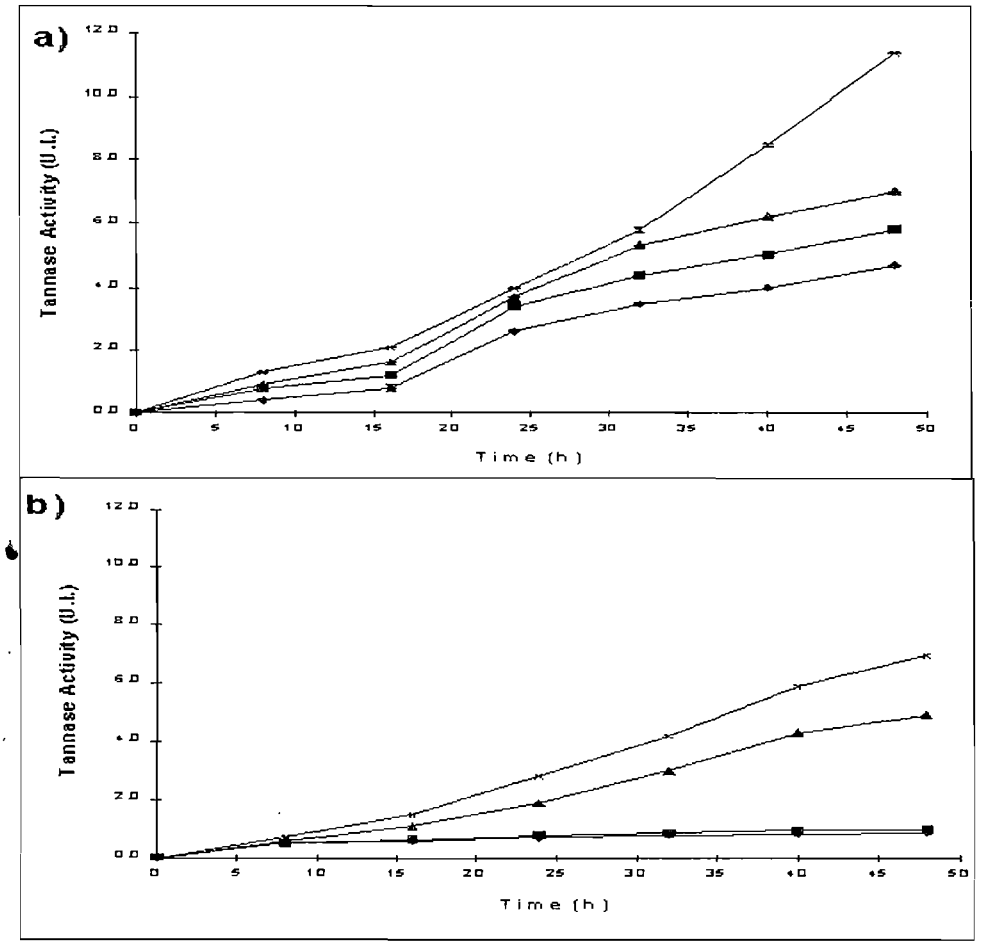


Figure 1. Extracellular (a) and intracellular (b) tannase production by *A. niger* Aa-20 in SSF with tannic acid concentrations of 12.5 (◆), 25.0 (■), 50.0 (▲) and 100.0 (✖) g/L.

RESULTS AND DISCUSSION

Tannase production in SSF

Tannase production (both intra-cellular and extracellular activity) by *A. niger* Aa-20 in the SSF process was seriously improved by the increase of the i initial tannic acid concentration. Figure 1a shows the kinetics of extracellular tannase production, while Figure 1b shows the results obtained by measuring intracellular tannase production. A consistent behavior was found, in which the increment in the tannic acid concentration is proportional to increases in tannase activity. In this study a maximum of tannase activity was reached with 100.0 g/L of tannic acid at 48 h. The decrease in tannase production by SSF was not found as reported by Lekha and Lonsane (1994). Lekha and Lonsane (1994) and García-Peña (1996) reported that tannase was wholly extracellular during the entire fermentation period as no intracellular enzyme was located in the fungal cells. This study revealed that the use of higher tannic acid concentrations promotes the expression of intracellular activity; these results might be due to the cells having a monitoring mechanism of the substrate levels in its environment, thereby inhibiting the excretion process when substrate is present in high concentrations. In this case, the extracellular/intracellular ratio was 1.3:1 for 50.0 g/L and 1.6:1 for 100.0 g/L; while that to 12.5 and 25 .0 g/L of tannic acid present the intracellular activitieswerelow, thus the extracellular/intracellular ratios were superior to 6:1 in both cases.

In this study the results of tannase production obtained in SSF system can be partially explained by those reported for pectinesterase and polygalacturonase production by Maldonado and Strasser de Saad (1998). They suggested that the high titres of enzymatic production obtained in SSF are due to changes in the composition of membrane fatty acids provoked by stress conditions favored by this enzyme production process when the substrate concentration is increased.

Tannic acid degradation in SSF

Table 1 shows a summary of the kinetic parameters evaluated in SSF systems. The tannic acid-degrading capacity of *A. niger* Aa-20 on SSF process was evaluated. This capacity was higher when the microorganisms grew on low and medium concentrations of tannic acid. This aspect is very important in the particular case where tannase could be used for the removal of phenolic compounds or tannins from waste water and coffee pulp.

In SSF, a particular behavior of kinetic parameters was showed. The product yield (Y_p), specific substrate uptake rate (q_s) and specific product formation rate (q_p) were higher to tannic acid concentration of 100.0 g/L. In addition, the higher tannase activity (both intracellular and extracellular) and lower uptake substrate percent was obtained too.

The analysis of the values of kinetic parameters obtained in SSF system shows to this process as a system very attractive to the degradation of hydrolizable tannins and tannase production.

Finally, if a suitable fermentation system is considered for the production of tannase, it is important to remember that some tannase production studies carried out on SmF indicated that this system was not meant for the longer fermentation times (Ganga *et al.*, 1978; Pourrat *et al.*, 1982) and the intracellular nature of the enzyme (Lekha and Lonsane, 1997). With respect to tannase production by SSF, results presented showed an increase in tannase activity with respect to tannic acid concentration present in the medium. In addition, *A. niger* Aa-20 was able to degrade high concentrations of hydrolyzable tannins. These results complement those reported by Lekha and Lonsane (1994) and Chaterjee *et al.*, (1996), with the testing of a model system using polyurethane foam as inert support. Thus, SSF should be adopted as tannase production system due to shorter fermentation time, higher activity titres produced and tolerance to high tannic acid concentrations. The next step of this work will evaluate the effect of tannase on the levels of tannins of coffee pulp.

Table 1. Summary of some kinetic parameters considered in the tannase production and tannic acid degradation by SSF

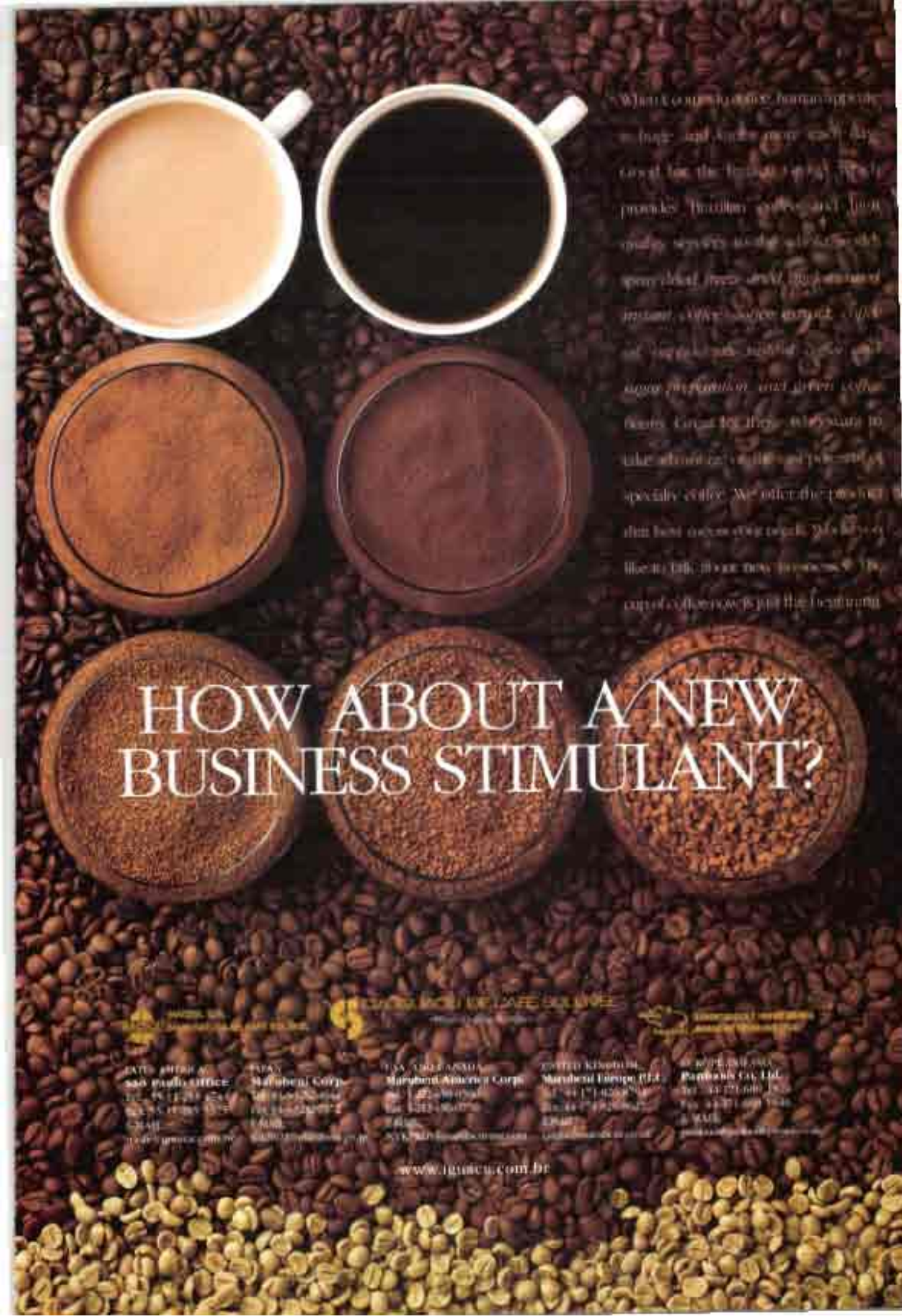
Tannic acid (g/L)	$\mu(h^{-1})$	$Y_{X/S}$(g X/g S)	Y_p(U/mg X)	Q_S (g X/g S-h)	Q_p (U/g X-h)	Substrate uptake (%)
12.5	0.288	0.306	1.385	0.942	0.399	100
25.0	0.295	0.163	1.443	1.812	0.426	100
50.0	0.223	0.091	1.469	2.440	0.328	100
100.0	0.217	0.074	2.183	2.929	0.474	73.03

KNOWLEDGEMENTS

C.N. Aguilar is member of the Food Research Dept. University of Coahuila, Saltillo Campus, México and wishes to thank the financial support of CONACYT and UadeC-DGEPI. The present work was performed as part of a cooperative agreement between the National Council of Science and Technology (CONACYT, México) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD-France) within a specific program undertaken at the Universidad Autónoma Metropolitana (México).

REFERENCES

1. Beverini, M. and Metche, M. 1990. Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Sci. Aliments*. **10**, 807-816.
2. Chaterjee,R., Dutta,A., Banerjee, R. y Bhattacharyya. (1997). Production of tannase by solid-state fermentation. *Bioprocess eng.* **14**, 159-162.
3. Coggon, P., Graham, N. and Sanderson, G. (1975). Cold water-soluble tea. U.K. Pat. 2,610,533.
4. Córdova-López, J., Gutiérrez-Rojas, M., Huerta, S., Saucedo-Castañeda, G. and Favela-Torres, E. 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnol. Tech.* **10**, 1-6.
5. De Rozo, M., Vélez, J. and García, A. 1985. Efecto de los polifenoles de la pulpa de café en la absorción de hierro. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 2, 287-305.
6. Ganga, P.S., Nandy, S.C. and Santappa, M. 1978. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase. *Leather Sci.* 23, 203-209.
7. García-Peña, I. (1996). Producción, purificación y caracterización de tanasa producida por *Aspergillus niger* en ferrmentación en medio sólido. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México.
8. Hakil, M., Denis, S., Viniegra-González, G. and Augur, C. 1998. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22, 355-359.
9. Lekha, P.K. and Lonsane, B.K. 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Proc. Biochem.* 29, 407-503.
10. Lekha, P.K. and Lonsane, B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44, 215-260.
11. Maldonado, M.C. and Strasser de Saad, A.M. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 34-38.
12. Pourrat, H., Regerat, F., Pourrat, A. and Jean, D. 1982. Production of tannase by a strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **4**, 583-588.
13. Zhu, Y., Smith, J., Knol, W. and Bol, J. (1994). A novel solid state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol. Lett.* **16**, 643-648.


HOW ABOUT A NEW BUSINESS STIMULANT?
www.iguacu.com.br

QUALIDADE DO CAFÉ SOLÚVEL BRASILEIRO

Paulo Lauro Correa de Oliveira

Empresa: Oliveira &Veiga Consultores Associados
Endereço: Rua Pistóia, 155- Londrina-86020-450-Brazil
E-mail: plauro@sercomtel.com.br - Phone/Fax:55-43-3223273

1-ESCOPO DA PALESTRA :

Demonstrar a importância do café solúvel brasileiro no contexto mundial.

2-OBJETIVO DA PALESTRA:

Demonstrar que a qualidade do café solúvel brasileiro já é reconhecida mundialmente e que essa industria traz ao país benefícios enormes no que se refere à: 1- agregar valor a nossa matéria prima; 2- vender marcas no Exterior(como Café Pelé) o mais conhecido;
3-novas tecnologias com conseqüente capacitação de mão de obra brasileira para enfrentar a mais rigorosas especificações;4-Introdução de modernas técnicas de Gestão da Qualidade(ISO 9001/ HACCP/GMP) e de Gestão Ambiental(ISO 14001) visando ao aumento da competitividade através da redução de desperdícios e retrabalhos.

3-DESENVOLVIMENTO:

A palestra contém 4 etapas a saber:
1ª -etapa - Introdução ao cenário mundial de café bem como do cenário do Brasil . Quantidades por safra 98/99 e 99/2000. Principais regiões produtivas brasileiras.
2ª -etapa - Apresentação da Indústria de Cafe Solúvel no Brasil. Como e por que começou? A capacidade industrial instalada..
3ª -etapa - Os principais mercados destinatários desse produto. Retrospectiva dos últimos 5 anos. Quantidade versus faturamento.
4ª -etapa - Sistemas de gerenciamento da Qualidade adotados pelo Setor do Solúvel brasileiro como ferramenta de modernização face a um mercado cada vez mais competitivo e global.

1a- ETAPA:

Slide12- Mostrou que a disponibilidade de café no mundo durante a safra passada foi de aproximadamente 104 milhões de sacas de 60 KG. Mostra o Brasil(33% do total) e demais países produtores de café em todos os continentes. O Brasil sem dúvida é o maior produtor dessa comodity no mundo.
Slide13- Mostra que além de maior produtor o Brasil foi também o maior exportador, sempre seguido da Colômbia.
Slide14-Mostra as principais regiões produtoras de café, onde Estado de Minas Gerais contribuiu na safra passada com 57% do volume produzido, ou seja, aproximadamente com19 milhões de sacas , seguido por Espírito Santo, São Paulo e Paraná. A safra passada contou com aproximadamente 35 milhões de sacas.
Slide15- Mostra que a safra atual terá uma quebra entre 30 a 35% em relação a safra anterior, o que quer dizer aproximadamente 23 milhões de sacas. A distribuição produtiva por estados permanecerá inalterada.

2a-ETAPA:

Slide18- Mostra uma exposição de fatos e motivos pela qual foi criada a indústria e café Solúvel no Brasil. A capacidade atual instalada está ao redor de 100 mil toneladas/ano. Sem dúvida somos, também, o maior produtor de solúvel do mundo.
Slide19- Os principais mercados do solúvel brasileiro- O primeiro foi os EUA, na década de 60. O Brasil foi o primeiro país a colocar solúvel na ex- União Soviética, ainda no final da década de 60. Hoje, os mercados da Rússia, leste europeu e china são os grandes objetivos .
Silde20e21- Mostram os principais exportadores de solúvel do Brasil nos anos de 1997 e 1998. A Cia Cacique de Café Solúvel é o maior exportador seguida pela Cia Iguaçu de Café Solúvel e pela Nestlé.

3a- ETAPA:

Slides23 e 24 - Mostram os principais destinos e quantidades exportadas nos últimos 5 anos pelo Brasil. Para a Rússia, EUA, CCE, Japão, etc. Destaque para as quantidades exportadas para a Rússia, as quais foram afetadas em 1998, em grande parte pela crise econômica mundial. Mostra também as quantidades de sacas de café verde necessários para transformar em solúvel

exportados, em relação ao volume faturado em US$.

4a- ETAPA:

Slide 27 e 28-Além de enfrentar tradicionais e fortes concorrentes multinacionais, tarifas alfandegárias diferenciadas, uma política interna que não contempla esse produto e face a um mercado cada vez mais global como manter-se competitivo? Além dos grandes investimentos tecnológicos nem sempre viáveis, como implantar e implementar técnicas que visem a capacitação de amo de obra para redução dos desperdícios? Por onde iniciar esses programas visando manter esse parque industrial atualizado com o mercado internacional?

Slide 29 e 30 - A experiência da Oliveira & Veiga consultores associados, nesse setor é comprovada não somente pela implementação, mas pela integração de técnicas e ferramentas num programa de Gestão Global entre Qualidade(ISO9001,ISO guide 25, HACCP, GMP, TPM, 5S,Cartão Vermelho, etc.) e Ambiental (ISO 14001, Atuação Responsável, Desenvolvimento Sustentável).

executado na Cia Cacique de Café Solúvel durante vários anos.

Slide 31, 32 e 33 - Mostra um exemplo de um a planta de café solúvel onde podemos visualizar, definir, identificar, estabelecer quais técnicas e ferramentas a adotar e integrar visando o "negócio" da empresa, como um todo.

Por exemplo, identificamos pontos de GMP(setas em azul) como também pontos de HACCP(em vermelho).

Slide 34, 35 e 36 - Mostra o Sistema de Gerenciamento Ambiental pela qual o Setor do Solúvel brasileiro já tem muita experiência, inclusive com patente na área de resíduos líquidos. Destaque para o fundamento da gestão Ambiental o qual está embasado na Identificação de Todos os Aspectos e Impactos Ambientais do negócio da empresa, ou seja, a planta de café solúvel as quais em sua maioria, se situam em zonas urbanas de grande densidade. Como resultado de ações já implementadas, a algumas fabricas já conseguem "zero emissões" ao meio ambiente, ou seja:

a)Resíduos sólidos - Queima total em caldeiras-economia de combustível.

b)Resíduos líquidos - Infiltração no solo com posterior monitoração.

c)Resíduos gasosos - Filtros e lavadores de gases, bem como otimização de outras fontes energéticas, ou seja, ao invés de óleo, gás GLP, ou gás natural para "mitigar" a emissão de SOx e NOx para atmosfera.

Slide 37-42 - Mostra que o parque industrial de café solúvel brasileiro dispõe de laboratórios equipados com modernos instrumentos para atender qualquer especificação, ou seja, físico, química , sensorial e microbiológica.

Slide 43 - A capacitação dos laboratórios brasileiros da industria de café solúvel provém em parte da participação dos mesmos no Comitê Técnico da ISSO o TC 34- SC15- que é o Sub-Comitê para Café, pois é o Fórum de debates para o estabelecimento de metodologias que facilitam o comércio internacional do café, alinhando as partes interessadas. Slide 44 - 48 - Desse modo o Brasil, na questão de padronização, de metodologias aplicadas a café verde, torrado e solúvel se mantém atento, através do estabelecimento de parcerias com Universidades e Institutos Oficiais, para a execução de projetos científicos e tecnológicos, como é o caso da Unicamp, Instituto de química de São Carlos - USP, Embrapa, Instituto Adolfo Lutz. Ital, etc.

4-CONCLUSÃO FINAL:

Qualidade é o atendimentos aos requisitos especificados. A indústria de café solúvel brasileiro tem ao longo de seus 35 anos de existência atingindo esse objetivo. A contínua implementação de modernas tecnologias e de técnicas de Gestão (Qualidade e Ambiente) será um fator diferencial de competição para as empresas brasileiras. Atualmente, podemos dizer que de posse de todos esses conceitos implementados, no dia a dia, o Brasil já possue um café quase que ecologicamente correto.

INFLUÊNCIA DA VARIEDADE BOTÂNICA SOBRE A QUALIDADE ORGANOLÉPTICA DO CAFÉ ESPRESSO

Marino Petracco

Illycaffè S.p.A. via Flavia 110 – Trieste (Italy)

SUMMARY

Espresso is a way to enjoy coffee that is gaining larger and larger popularity worldwide. The cup produced by this brewing method contains a beverage with a high concentration of sensorially active substances: special care must therefore be devoted to prevent and to eliminate defects from the raw material. Moreover, attention should be paid to the variables tending to affect the sensory balance appreciated by consumers. Little is known about their influence on Espresso beverage quality, and genetic parameters are often neglected to the benefit of local traditional cultivars.

Coffee improvement programs relying on hybridisation did focus so far essentially on agronomic traits like increased yield and resistance to diseases. Strong market demand for quality coffee has now directed attention to breed for new varieties with enhanced aroma and taste. The experimental work outlined in this paper describes how a tool for sensory evaluation of breeding products must consider each of the five human senses which, with the possible exception of hearing, are involved in the appreciation of an Espresso cup. Resulting figures indicate that the botanical origin of Coffea arabica plants is indeed important to get the best industrial outcome in the production of coffee beans appropriate for Espresso preparation.

INTRODUÇÃO

O Espresso representa uma das maneiras para tomar uma xícara de café que nos dias atuais está a ganhar uma grande popularidade no mundo inteiro. As raízes desta popularidade podem ser encontradas na cultura italiana das comidas e bebidas, onde desenrolou-se um estilo de vida típico estreitamente ligado à bebida de café [1]. As principais características do Espresso são:

a) preparação extemporânea, expressamente requisitada pelo consumidor;

b) um método específico de infusão utilizando uma **pressão da água muito alta;**

extração rápida, para que só o material melhor possa ser introduzido na xícara.

A bebida obtida com o acima especificado tratamento, resulta ser muito característica também se considerada da perspectiva física e química [2]. Todavia, as particularidades mais significativas do Espresso são constituídas pela natureza sensorial delas. Todos os sentidos do homem, exceto o **ouvido**, são utilizados na degustação duma xícara de Espresso:

- a **visão** avalia o aspecto da espuma, examinando a cor como a consistência e persistência dela ;
- **tato** avalia a sensação da bebida no interior da boca conhecida também como "corpo", ou seja a propriedade ligada à densidade e à viscosidade;
- **gosto** estima o balanceamento amargura/acidez e a presença de um retrogosto doce-caramelo;
- **olfato** prevê a **fragrância**, por meio da inalação dos vapores originários da xícara,e ***flavor***, ou seja a percepção nasal das substâncias voláteis desenvolvidas no interior da boca.

O método de extração do Espresso produz na xícara uma alta concentração de substâncias sensorialmente ativas: por isso, é preciso ter muito cuidado no que diz respeito à prevenção e à eliminação dos defeitos provenientes do café cru. Além disso, para puderem oferecer aos consumidores a qualidade sensorial mais fina, é preciso ter cuidado com as diferentes variáveis que influenciam o equilíbrio sensorial que os consumidores apreciam.

È conhecimento comum que fatores como a região de produção e a altitude, bem como a situação climática e a técnica de processamento, podem afectar a qualidade do café na globalidade dela, sobretudo respeito ao incremento da acidez e do aroma. Isto foi demonstrado, em ambientes selecionados, pelos dados experimentais [3].

Infelizmente, sabe-se pouco em relação às influências deles sobre à bebida Espresso.

Os parâmetros genéticos foram durante muito tempo transcurados ao benefício das tradicionais *cultivares* locais e, ainda mais, os programas de melhoramento do café que se fundavam sobre a reprodução, tinham o hábito, com poucas exceções [4, 5, 6], de se focalizar principalmente nas características agronômicas tal como pode ser um aumento da produtividade e a resistência a pragas e doenças.

No presente estudo tomamos em consideração a importância da influência sobre a qualidade do Espresso da variabilidade genética, constituída pelas diferentes características de plantas de café que se desenvolveram juntas nas mesmas condições geográficas e utilizando sempre o mesmo processamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cerca de 20.000 (vinte mil) mudas de *Coffea arabica* identificadas individualmente foram plantadas e cultivadas numa boa região de produção de café, situada no Brasil a cerca de 21° Sul, 1040 m de altitude, com uma temperatura média que varia entre os 20°C e os 26.4°C [7]

Uma possível regra de ajuntamento para pudermos descrever a população de café acima mencionada seria de as reunirem segundo a própria variedade botânica de origem:

CA:	acrônimo por	Caturra
CR:	"	Catimor
CTR:	"	Catuai Vermelho
CTY:	"	Catuai Amarelo
IC:	"	Icatu

Junto com *cultivares* tradicionais bem conhecidas, foram escolhidas duas variedades híbridas derivantes de cruzamentos inter-específicos: Catimor e Icatu. Isto foi feito pelo interesse de explorar a qualidade em xícara de plantas que contêm algumas características herdadas da espécie Robusta, e que as tornam particularmente interessantes aos olhos dos técnicos do café graças à presença de vantagens agronômicas, introduzidas pelo processo de hibridação, que merecem atenção.

Está amplamente aceitado o fato de o nome Robusta ser atribuído à variedade mais cultivada de *Coffea canephora* pela resistência dela em ambientes tropicais úmidos. Esta variedade demonstrou uma pronunciada imunidade no que diz respeito quer à ferrugem das folhas (*Hemileia vastatrix)* [8] quer aos nematóides das raízes (*Meloidogyne* spp.) [9].

Os produtores de café tentaram, durante muito tempo, o cruzamento da diplóide Robusta com a tetraplóide Arábica, obtendo, na maioria dos casos, plantas estéreis.

Uma exceção foi alcançada da natureza com o espontâneo híbrido de Timor, o qual pareceu ter origem dum cruzamento na selva pela polinização entre uma planta Arábica e um raro gameta de Robusta não reduzido. Mais cruzamentos com a variedade Caturra levaram às progênies, resistentes à ferrugem, que têm vários nomes conforme o país: Catimor no Brasil e na América Central, Colombia em Colombia, Ruiru 11 no Quênia.

Um distinto experimento foi obtido com sucesso no Brasil, onde uma planta de Robusta tetraplóide foi produzida graças à duplicação dos cromossomos induzida com colquicina. O cruzamento dela com a variedade da Arábica Mundo Novo tem produzido diversas linhagens resistentes e altamente produtivas, às quais foi dado o nome de Icatu.

Pelo fato de não termos descoberto durante a prova da xícara preliminar nenhum caráter típico do café Robusta, concentramos a nossa atenção na seleção de linhagens destas variedades prometedoras do ponto de vista agronômico, que fossem também produtoras de bebida superior.

Os métodos de processamento agrícola que utilizamos foram aqueles típicos do lugar: plantio não sombreado semi-adensado com 1666 plantas por hectare, e mais algumas operações orientadas à qualidade, tal como uma adequada fertilização, uma regular vaporização de pesticidas, controle do mato, colheita manual, despolpamento, processamento da cereja mediante fermentação.

Além das avaliações químicas e agronômicas, cada planta adulta individual foi avaliada pela qualidade Espresso.

A colheita das plantas uma por uma foi levada a cabo manualmente, com muito cuidado para evitar a presença de cerejas não maduras, maduras demais ou estragadas. A safra de cada planta individual, com cerca de 3 kg de cerejas, foi despolpada mecanicamente. Os grãos resultantes, com o pergaminho mucilaginoso, acabaram o processo de fermentação no interior de baldinhos individuais, pela ajuda de um enzima pectólita (Isozym) em maneira tal de estandardizar o período de fermentação entre todas as amostras. Depois da secagem e do descascagem, as amostras de café ouro foram para o laboratório da illycaffè em Trieste (Itália), onde se desenrolaram as análises organolépticas.

As amostras foram processadas de acordo com os métodos ideados para a avaliação de amostras comerciais [10] no laboratório da Illycaffè:

os defeitos visíveis (grãos pretos, quebrados, imaturos) foram eliminados manualmente cada amostra foi torrada à maneira italiana, utilizando 80 g por amostra seguindo condições controladas em equipamento de laboratório para torrefação (Probat) e moagem até à granulosidade ideal mediante moinhos profissionais (Faema) cada amostra, torrada e moída, foi avaliada em três xícaras diferentes, segundo três técnicas de preparação específicas:

- Espresso: a clássica xícara de Espresso, preparada mediante condições estandardizadas e cuidadosamente controladas [11]. A bebida derivante é constituída por uma solução de cafeína, açucares e ácidos, na qual está dispersa uma emulsão: fase distinta composta de gotinhas micronicas de lipídios.

A concentração total poderia ser tal como 60 g/l.

- infusão, uma técnica amplamente utilizada no Norte da Europa e nos E.U.A.: deita-se água

fervente diretamente no café moído grosso deixando-o repousar por um dado período de tempo antes de o filtrar do restante líquido claro do café.

A concentração da bebida resulta ser baixa (menos de 20 g/l) e apenas as substâncias solúveis passam na xícara, conferindo-lhe o caráter típico do café filtrado.

• Espresso diluído, para que é preciso tirar e diluir com água quente uma pequena alíquota de Espresso, até a obtenção do mesmo conteúdo de sólidos no infuso. Assim, a alta concentração do Espresso regular não impede mais a avaliação de algumas nuances de aroma mais fracas, e pode ser determinada também a diferença entre a característica aromática da solução e da emulsão.

Doze amostras por dia foram submetidas a um *panel* da prova da xícara, formado por pelo menos três peritos profissionais treinados, e foram examinadas mediante provas cegas absolutas onde algumas variantes complexas, por exemplo o mérito geral, foram determinadas mediante comparação com o paradigma mental presente na memória de cada perito dada pela experiência anterior. A escala utilizada abrange uma pontuação entre –3 e 0 do lado negativo e entre 0 e +3 naquele positivo, definindo "indicadas para Espresso" somente aquelas amostras que obtêm a partir de +1 até +3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

São disponíveis duas séries de dados, relativos às safras de 1990 e 1991.

Um total de 585 plantas foram avaliadas em 1990 e mais 225 em 1991, numa totalidade de mais de 800 amostras.

Como é dado pela distribuição do mérito geral destas análises sensoriais, (veja fig.1), somente algumas amostras (menos de 10%), nomeadamente aquelas com resultado -2, foram penalizadas pelo gosto desagradável (estínquer, riado, imaturo). Este sucesso pode ser atribuído ao método de processamento "lavado", que permite a eliminação de alguns grãos inaceitáveis pela flutuação, melhorando assim a qualidade [12]. Do outro lado, podemos infelizmente dizer que apenas 20% das amostras foram consideradas "indicadas para Espresso" como definido acima (mérito +1).

Com o objetivo de encontrar uma relação entre o genótipo do café e a "qualidade Espresso", organizamos os dados relativos ao 1990 como na fig. 2:

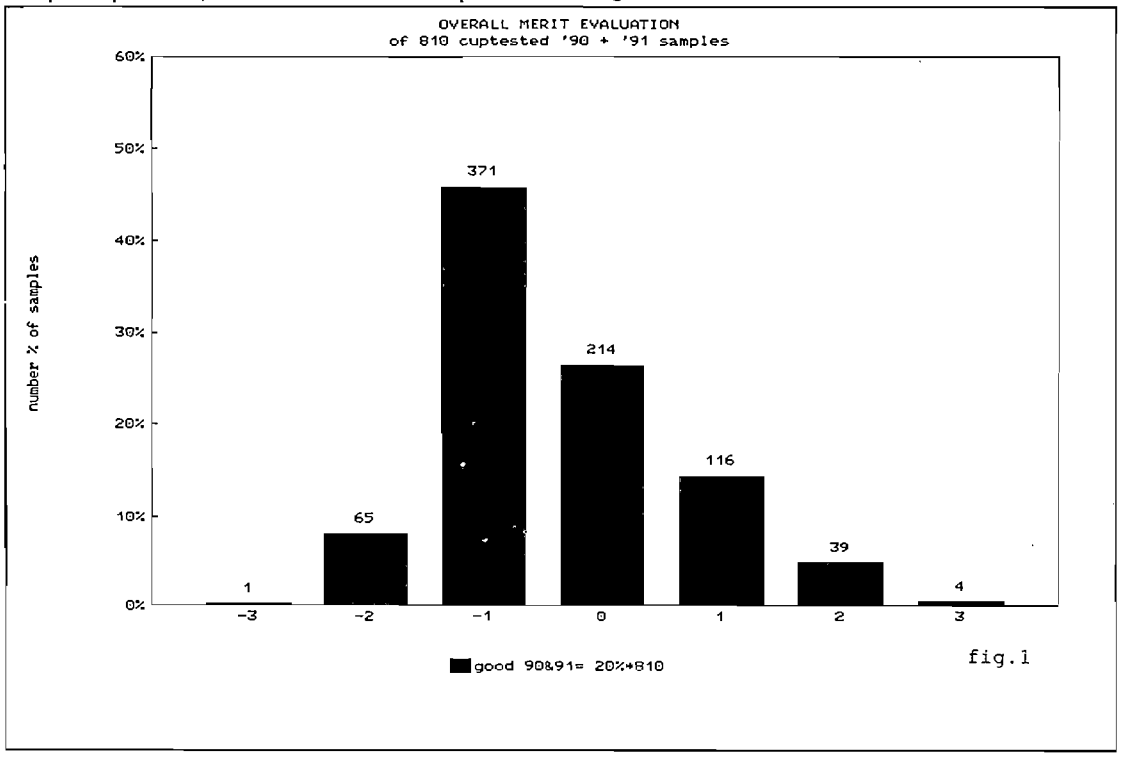


fig.1

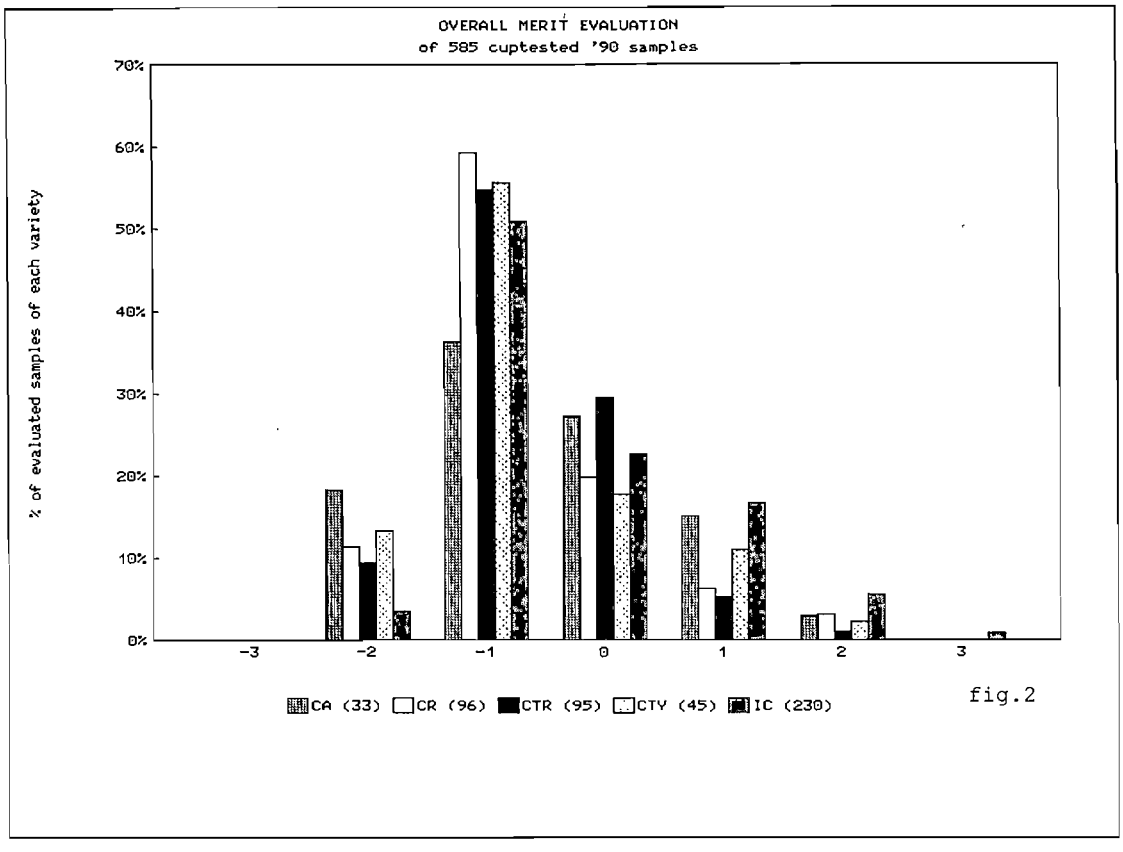


fig.2

Todas as variedades de café examinadas mostraram características sensoriais irregulares, com a presença de amostras boas e menos boas.
Todavia, verifica-se uma tendência evidente da "qualidade Espresso" no momento em que consideramos a percentagem das amostras "aceitáveis para Espresso" (o seja mérito):

Caturra	CA	45%
Catimor	CR	29%
Catuai Vermelho	CTR	35%
Catuai Amarelo	CTY	31%
Icatu	IC	46%

Esta tendência é confirmada pelo exame dos dados do 1991 (onde os números de Caturra
Nas amostras "aceitáveis para Espresso" (mérito), o Icatu alcança um considerável 51% se comparado com 31% do Catimor. Segundo um critério de classificação mais rígido, nomeadamente a classe de qualidade chamada "indicada para Espresso" (mérito +1), o êxito das amostras de Icatu é mais que o dobro dás do Catimor: 24% vs. 10%. A presença de 12% de amostras de Catimor não idôneas (mérito –2), até comparadas com 4% das amostras não idôneas de Icatu, resulta não ser tão importante, já que precisa considerar o fato de algumas amostras serem defectivas ou desventuradas, e pode ser tiveram de ser tirados por causa das poucas amostras examinadas):

Catimor	CR	41%
Catuai Vermelho	CTR	49%
Catuai Amarelo	CTY	64%
Icatu	IC	63%

Todas as variedades de café mostram uma flutuação na estima de um ano para o outro: isto pode ser explicado por um melhoramento geral no que diz respeito às amostras de 1991.
Na comparação direita dos dados combinados (1990 + 1991) das duas variedades Catimor e Icatu, a diferença entre os dois está muito acentuada, como pode ser verificado na fig. 3:
atribuído aos acidentes ocorridos durante o processamento.
Pelo contrário, queria tomar a Vossa atenção no que diz respeito à diferença das amostras consideradas como inaceitáveis sem ser repulsivas (mérito = –1): esta pontuação, de regra, significa uma relação não balançada entre amargura e acidez, uma falta de aroma e corpo e uma leve presença de adstringência. Todas estas características podem ser vistas como uma peculiaridade de origem botânica, e induzidas pelos tratos genéticos de uma variedade particular.
De acordo com os nossos dados atuais, concluímos dizendo que começa-se a acreditar

que a origem botânica das plantas de *Coffea arábica* revela-se muito importante para garantir o melhor resultado possível do ponto de vista industrial no que diz respeito à produção de café Espresso.

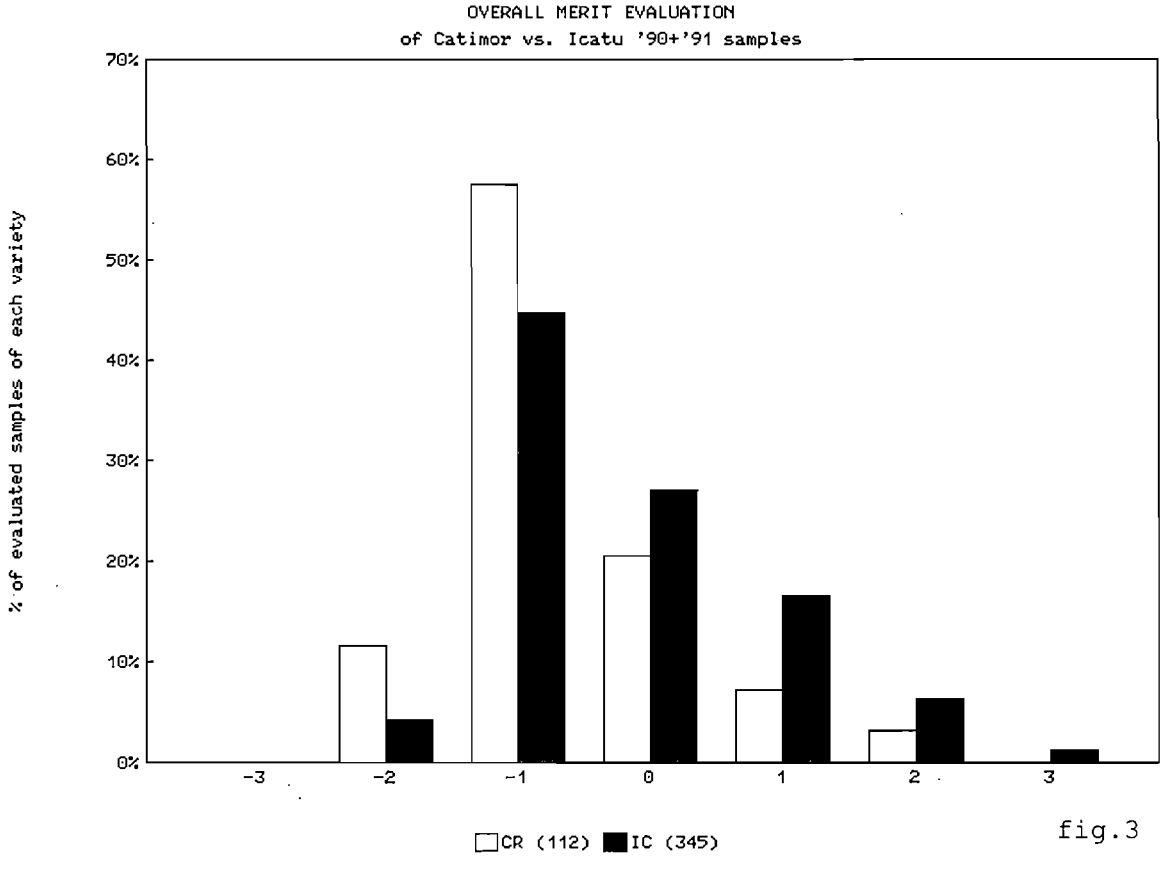


fig.3

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Illy R.& Illy F.: "*From Coffee to Espresso*" - Mondadori/Milano, 1990 p.166-188.

[2] Petracco M.: "Physico-chemical and Structural Characterisation of Espresso Coffee Brew" in *XIII colloque ASIC*: Paipa (Colombia) 1989.p.246-261

[3] Guyot B. et al.: "Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica" in *Plantations, récherche, développement* 1996 vol.3 n.4 p.272-280.

[4] Moschetto D. et al.: "Rèsultats récents sur l'amélioration génétique de la qualité à la tasse de *Coffea canephora* en Côte d'Ivoire" in *XVI colloque ASIC*: Kyoto (Japan) 1995 p.55764.

[5] Moreno G. et al.: "Bean characteristics and cup quality of the Colombia variety (*Coffea arabica*) as judged by international tasting panels" ibidem p.574-583.

[6] Roche D.: "Coffee genetics and quality" ibidem p.584-588.

[7] Sondahl M.R.& Bragin A.: "Somaclonal Variation as a Breeding Tool for Coffee Improvement" in *XIV colloque ASIC*: S.Francisco (USA) 1991 p.701-710.

[8] Osorio Garcia F.O.: "Evaluaciòn de la estabilidad del rendimiento de introducciones en un ensaio regional de café" *in IX reuniòn regional de mejoramento de café de PROMECAFE'*: Managua (Guatemala) 1990.

[9] Anzueto F. et al.: "Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nematodos de America Central" *in XVII simposio sobre la caficultura latinoamericana*: San Salvador (El Salvador) 1995.

[10] Illy A.& Viani R. eds: *"Espresso Coffee: The Chemistry of Quality"* Academic Press/London, 1995 p.222-223.

[11] ibidem - p.195

[12] ibidem - p.42

A QUALIDADE DO CAFÉ PRODUZIDO EM DIVERSAS REGIÕES DO BRASIL

José Guilherme Cortez

Divisão de Desenvolvimento Rural Ministério da Agricultura Av. Heitor Penteado, 214513087-000 CAMPINAS- SP

INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira apresentou uma sensível renovação a partir da década de 60, através da introdução de variedades mais produtivas da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), ao lado das adubações químicas e do apoio creditício e orientações técnicas do Instituto Brasileiro do Café. Embora a maior atenção da nova cafeicultura brasileira fosse direcionada à maior produtividade, as recomendações sobre a qualidade traduziam-se pelos maiores cuidados com a colheita, como a colheita no pano, a separação dos cafés de varrição e ao uso do sistema de preparo via despolpamento, em regiões com problemas de bebida.

A abertura de novas áreas para a cafeicultura, sob critérios de expansão geográfica ou para fugir das geadas, trouxe à tona alguns novos conceitos sobre a qualidade do café brasileiro, especialmente aquele produzido em regiões de clima seco e frio durante a fase de colheita e processamento, como no Cerrado Mineiro (regiões do Triângulo Mineiro / Alto Paranaíba). Sob estas condições de clima, os ciclos fenológicos do cafeeiro eram mais lentos e regulares, a colheita mecânica era favorecida, os processos fermentativos não eram estimulados durante a secagem dos grãos e as características organoléticas do produto eram bastante indicadas para modernos sistemas de preparo da bebida, como o "café expresso".

Os processos fermentativos foram definidos como a ação prolongada de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras dos gêneros *Klebsiella* , *Aspergillus, Fusarium* e *Saccharomyces spp.* Onde as condições de clima ou tecnologia são favoráveis para o desenvolvimento microbiano, é promovida uma degradação da mucilagem e a produção de álcoois e ácidos; se o processo fermentativo for interrompido após o consumo da camada mucilaginosa , o grão não é atacado e a qualidade da bebida é preservada; isto é observado quando se retira o café dos tanques de fermentação (produção de café despolpado) ou quando a umidade do grão é levada a um ponto em que não ocorre desenvolvimento microbiano (secagem do grão). Ao contrário, quando o processo fermentativo não é interrompido, as camadas celulares da semente são degradadas, diversos compostos químicos são alterados e observa-se uma alteração da bebida (formação do gosto Rio) ou a ocorrência de grãos defeituosos (defeitos pretos e ardidos).

A melhor compreensão dos processos fermentativos que o grão de café está sujeito, durante as fases de maturação, colheita e processamento, levou ao desenvolvimento de um novo sistema de preparo do café, conhecido como "cereja-descascado". Nesse processo, combina-se a colheita por sistema de derriça (mecanizada ou manual) com a separação das diversas fases de maturação do café colhido (verdes ou imaturos, cerejas ou maduros e secos ou sobremaduros); após a retirada da casca (exocarpo) dos grãos maduros, estes são colocados para secar em camadas finas e as diferentes fases são secadas e comercializadas isoladamente. Com isso, diminui-se a ocorrência de grãos imperfeitos ou fermentados e observa-se uma nítida melhora na qualidade do café produzido, mesmo em regiões de clima desfavorável para a bebida.

A generalização dos conceitos de qualidade do café brasileiro, em função do clima, da tecnologia aplicada e das características sensoriais obtidas, leva agora ao estabelecimento de "marcas" ou certificados de origem, sustentando uma campanha publicitária eficiente e atendendo os diversos sistemas de preparo de bebida e desejos dos consumidores. Nesse contexto, são incluídos também a ampliação e diversificação do mercado interno brasileiro e a utilização mais difundida dos cafés robustas produzidos no Estado do Espírito Santo, Sul da Bahia e Rondônia.

Nesse trabalho, são apresentados os resultados de análises físicas e sensoriais de amostras representativas das diferentes regiões e sistemas de produção e processamento agrícola dos cafés do Brasil, com comentários sobre suas possíveis indicações para formas de consumo, dentro de uma integração mais ampla dentro do agronegócio café.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras analisadas foram obtidas de diversos sistemas agrícolas, segundo o esquema seguinte:

- Espécie cultivada : *Coffea arabica* e *Coffea canephora*
- Clima da região produtora (especialmente durante a colheita e o processamento agrícola)
- Plantio e condução agrícola (espaçamento, irrigação, condução orgânica)
- Colheita e processamento (despolpamento, cereja-descascado, secagem)

As análises físicas e sensoriais foram realizadas conforme as instruções contidas na Classificação Oficial por Tipos e Bebidas, adotada no Brasil (MIC/IBC, s.d.). À esta, adicionaram-se as descrições sensoriais recomendadas pela Unidade Sensorial da Organização Internacional do Café (FERIA-MORALES, 1989), classificadas segundo as intensidades de gosto (acidez, amargo, doce, salgado e azedo), sensações bucais (corpo e adstringência) e sabores/aromas (queimado, químico/medicinal, fermentado, chocolate, etc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra alguns resultados sensoriais de amostras de café colhidas no Estado do Paraná, na região conhecida como "Norte Velho" (Ribeirão Claro, Tomasina), em comparação com o sistema de processamento por via seca em Londrina e uma amostra de Apucarana (altitude de 900 m). As condições de inverno úmido, sem déficit hídrico no momento da colheita, determinam a ocorrência de processos fermentativos deletérios para a qualidade da bebida (Rio ou Riada). Entretanto, o sistema de processamento via "cereja-descascado" torna-se mais adequado para os plantios adensados (maiores populações de cafeeiros por área) e permite a expressão das características sensoriais (corpo, acidez) de elevada aceitação pelos mercados mais exigentes em termos de qualidade. A utilização de um processo de secagem lento, com um intervalo de descanso antes do armazenamento, resulta em notas mais altas para o item aspecto dos grãos. A região de Apucarana mostra um inverno mais seco (devido à altitude), o que somado à maturação lenta, confere à bebida intensidades mais altas.

No Estado de São Paulo, podem ser encontradas três regiões cafeeiras distintas: *Araraquarense* (Catanduva, São José do Rio Preto), *Média Paulista* (Garça, Marília) e *Alta Mogiana* (Franca, Pedregulho), com ainda uma quarta região (*Média Sorocabana*: Avaré, Assis) com condições climáticas semelhantes àquelas de Londrina. As duas primeiras caracterizam-se pelos plantios em torno de 600 m, com elevadas temperaturas médias anuais e elevado déficit hídrico durante a época de colheita, o que condiciona os ciclos mais curtos entre as floradas e a maturação dos grãos e à ocorrência de bebida Dura, com elevada sensação bucal de adstringência. Na região da Alta Mogiana, os plantios estão localizados em altitudes mais elevadas (900 — 1000 m), com temperaturas amenas e elevado déficit hídrico durante a colheita; com isso, determina-se a ocorrência da bebida Mole, com corpo elevado e aroma achocolatado. A Tabela 2 mostra algumas características físicas e sensoriais destas localidades. Pela sua grande extensão territorial e diversidade de microclimas, o Estado de Minas Gerais apresenta cinco regiões cafeeiras distintas: ***Sudoeste*** (Ouro Fino, Alfenas, Varginha), com altitudes elevadas a médias, amplitude de déficit hídrico (elevado a baixo) e variação de bebida (Mole a Riada/ Rio), principalmente em função da proximidade de represas; ***Centro-Sul*** (Santo Antônio do Amparo, Formiga), com temperaturas médias anuais mais elevadas; ***Triângulo Mineiro / Alto Paranaíba***, com cultivo ***com irrigação*** em áreas de déficit hídrico muito elevado (Araguari, Monte Carmelo) e ***sem irrigação*** em áreas mais altas (São Gotardo, Serra do Salitre), com bebida variando desde Dura até Mole; e ***Zona da Mata / Alto Rio Doce*** (Caratinga,

Tabela 1 — Características físicas e sensoriais de cafés arábicas do Estado do Paraná

Origem	Processo	Aspecto	Bebida	Acidez	Corpo	Aroma
Londrina	terreiro	Regular	Rio	Regular	bom	fermentado
Apucarana	CD	Bom	Mole	Alta	alto	agradável
Ribeirão Claro	CD	Bom	Mole	Média	alto	agradável
Tomasina	CD	excelente	Mole	Média	alto	agradável

Tabela 2 — Características físicas e sensoriais de cafés do Estado de São Paulo

Origem	Processo	Aspecto	Bebida	Corpo	Adstringência	Aroma
Catanduva	terreiro	regular	Dura	Regular	alta	metálico
Marília	terreiro	regular	Dura	Regular	alta	metálico
Franca	terreiro	bom	Mole	Alto	Baixa	chocolate
Avaré	terreiro	bom	Rio	Bom	média	químico

Tabela 3 — Características sensoriais de diversas regiões de café arábica do Estado de Minas Gerais

Origem	Cultivo	Processo	Bebida	Corpo	Acidez	Mercado
Ouro Fino	Normal	CD	Mole	médio	alta	gourmet
Alfenas	Normal	Terreiro	Riada/Rio	médio	média	Rio
Alfenas	Normal	CD	Mole	médio	alta	gourmet
Formiga	Normal	Terreiro	Dura	alto	média	expresso
Araguari	irrigado	Terreiro	Dura	alto	média	expresso
São Gotardo	normal	Terreiro	Mole	alto	média	expresso
Manhuaçú	normal	Terreiro	Rio	médio	média	Rio
Manhuaçú	normal	Despolpado	Mole	médio	alta	gourmet
C. Paranaíba	orgânico	Terreiro	Mole	alto	alta	gourmet

Manhuaçu / Capelinha, Novo Cruzeiro), com plantios em vales nebulosos ou espigões com nuvens cativas e ocorrência de bebida Rio (cafés de terreiro) ou Mole (cereja-descascado ou despolpado). Os cafés encontram grande diversidade de mercados, atendendo às várias exigências dos compradores, desde aqueles apreciadores da bebida Rio (Arábia Saudita, Turquia, Grécia) até os mercados chamados "gourmet" e apreciadores do "expresso" (USA, Japão, Europa); entre estes, encontram-se os apreciadores do café orgânico (Carmo do Paranaíba), sem o uso de pesticidas e herbicidas e mostrando grandes vantagens no aspecto dos grãos (aumento no tamanho dos grãos), produção (diminuição nas variações de produção a cada dois anos) e bebida (um ou dois pontos acima da média em corpo e aromas). Os resultados de amostras do Estado de Minas Gerais são mostrados na Tabela 3.

O Estado do Espírito Santo apresenta duas regiões cafeeiras distintas, caracterizadas pela altitude da região de plantio: em altitudes superiores a 600 m é cultivada a espécie arábica (Iúna, Domingos Martins) e em regiões com altitudes inferiores a 600 m é cultivada a espécie robusta, em especial a variedade conilon (São Gabriel da Palha, Colatina). No robusta, as condições de clima determinam também a necessidade de irrigação durante o verão, para assegurar a disponibilidade de água durante a fase de maior desenvolvimento do fruto. Algumas regiões de transição entre as altitudes (Município de Pancas) são aptas para o cultivo do conilon, com características sensoriais peculiares. A classificação do robusta deve ser diferente daquela do arábica, sendo apresentada aqui uma classificação especial de torra — graduação de **excelente** (cor uniforme quase total) até **má** (cor desigual) e uma análise de bebida — descrição de **excelente** (bebida com sabor neutro e alguma acidez) até regular (bebida com forte gosto de robusta). A Tabela 4 mostra as análises sensoriais de cafés arábicas e robustas do Espírito Santo.

O Estado da Bahia tem se mostrado como uma das regiões de maior crescimento do parque cafeeiro, além de uma eficiente renovação de áreas já tradicionais de arábica no estado. O aumento de procura do café conilon para o consumo interno, ao lado dos problemas que dificultam a cultura do cacau no Sul da Bahia, tem levado à substituição das lavouras cacaueiras pela cultura do conilon, com resultados bastante promissores para o desenvolvimento agrícola da região, especialmente em Ilhéus, Camacã e Canavieiras. Em altitudes mais elevadas, no centro-sul do estado, as lavouras de café arábica utilizam a irrigação durante o verão, promovem a colheita pelo sistema "a dedo" e promovem a secagem dos grãos em altitudes mais baixas. É o caso, por exemplo, dos plantios localizados no Planalto de Vitória da Conquista (Barra do Choça), onde o café é plantado nas altitudes mais elevadas e levado para secar na caatinga; este tipo de processamento dá suporte a uma campanha de propaganda, caracterizando o "Café da Caatinga". Os plantios localizados mais ao norte, ainda em locais elevados, tem buscado também novas formas de propaganda de seus produtos, como no caso de Mucugê, na Chapada de Diamantina. A prática adotada de colheita a dedo e a combinação com o processo cereja- descascado confere a este café características sensoriais bastante destacadas, o que se reveste de um atrativo a mais para a região além de suas belezas naturais. Ao lado dos plantios de café.

Tabela 4 — Classificação sensorial de cafés do Estado do Espírito Santo

Origem	Espécie	Processo	Torra	Bebida	Acidez	Corpo	Mercado
Iúna	Arábica	Terreiro	Regular	Rio	média	Baixo	Rio
Iúna	Arábica	CD	boa	Mole	alta	Alto	gourmet
S.G. Palha	Robusta	Terreiro	má	Regular	média	Médio	solúvel
S.G. Palha	Robusta	CD	boa	Excelente	média	Alto	exportação
Pancas	Robusta	Terreiro	boa	Boa	baixa	Alto	exportação

Tabela 5 — Características físicas e sensoriais de cafés arábicas e robustas do Estado da Bahia

Origem	Espécie	Condução	Colheita	Processo	Secagem	Bebida
Canavieiras	robusta	normal	Derriça	CD	secador	excelente
B. Choça	arábica	irrigado	A dedo	Terreiro	caatinga	Mole
Mucugê	arábica	irrigado	A dedo	CD	secador	Mole
Barreiras	arábica	irrigado	Mecânica	via seca	secador	Mole

robusta no litoral, outra área de grande desenvolvimento no estado é o polo cafeeiro do Oeste da Bahia, na região de Barreiras. O sistema de condução agrícola é por irrigação e a mecanização se estende até a colheita e secagem, com colhedeiras automotrizes e secadores mecânicos. Novos projetos de cultura irrigada estão sendo introduzidos nesta região, abrindo novas fronteiras para a cafeicultura brasileira. A Tabela 5 mostra os resultados físicos e sensoriais dos cafés da Bahia.

CONCLUSÕES

A cafeicultura brasileira tem mostrado sensíveis mudanças em seus aspectos de qualidade. Dos antigos conceitos de caracterização de sua bebida como Dura, com aromas/sabores iguais a metálico ou pela ocorrência de bebida Rio, pode-se verificar agora a difusão e fortalecimento do binômio produtividade — qualidade, especialmente na fase agrícola do agronegócio café. Os novos sistemas de processamento, ao lado de técnicas agrícolas como irrigação para asseguramento das safras, têm resultado em ofertas no comércio de sacas de café com menos defeitos, aparência mais homogênea, melhores resultados durante a torração e maior aceitação por parte dos consumidores.

O uso de práticas culturais, como a irrigação, controle de pragas e doenças, melhor quantificação e fracionamento dos nutrientes promove menores custos de produção, altas produtividades e o fortalecimento da atividade agrícola. O melhor conhecimento das condições climáticas em cada região leva à escolha da espécie cultivada, da população por área, à maior garantia da produção esperada, à seleção de um ou outro sistema de colheita ou processamento e à adequação de cada produto para um ou outro sistema de torração e consumo.

Muitos desses resultados são devidos ao melhor conhecimento dos processos fermentativos que ocorrem durante a maturação, colheita, processamento e armazenamento dos grãos de café. Sabe-se que umas regiões são mais propícias para os processos fermentativos que outras; isto é facilmente percebido em plantios próximos de reprêsas ou em regiões de presença duradoura de nuvens cativas ou neblina. Mas o isolamento dos grãos defeituosos e a rápida desidratação dos lotes de café nos terreiros, como é feito no sistema cereja descascado, dificulta a ação dos microrganismos e cria um ambiente mais adequado para a preservação da qualidade do café. Estes resultados podem ser também conseguidos com o uso de isolados microbianos ou pela pulverização de produtos bioestáticos, como aqueles à base de amônia quaternária (Fegatex).

O uso potencial de biotecnologia na formação de aromas também pode ser esperado.

5. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO / INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. Classificação do Café: noções gerais. Rio de Janeiro: Setor de Publicação Gráfica, IBC/GERCA, s.d., 117 p.

FERNANDEZ-MORALES, A. The research and test unit of the International Coffee Organization scientific activities focusing on the quality of coffee. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 13. Paipa. Paris: ASIC, 1989, p. 159-180.

POTENCIAL DE MERCADO DE CAFÉS ORGÂNICO E ESPECIAL.

Ivan Franco Caixeta

Produtor de café orgânico, Eng. Agrônomo M.Sc., Professor da Esacma Machado -MG

INTRODUÇÃO

Em franca expansão a agricultura orgânica está ganhando terreno em todo o mundo. Na Europa e nos Estados Unidos da América a área cultivada sem agrotóxicos esta crescendo 30% ao ano e no Brasil, o aumento anual chega a 10%. A agricultura orgânica tem sido tema de amplos debates recentes sobre os rumos da produção e é hoje uma realidade nacional e internacional. Folha de São Paulo, 20/10/98).

A agricultura orgânica reaparece como uma alternativa para fazer sua parte em tentar reequilibrar os exageros e os desequilíbrios causados pela agricultura química que apesar de altas tecnologias e da chamada revolução verde não resolveu a falta de alimentos no mundo, mas trouxe grandes danos ao nosso ecossistema e a qualidade de vida do consumidor. Hoje a pressão por parte de organizações internacionais e do próprio consumidor, quanto aos aspectos de preservação e sustentabilidade do meio ambiente tem levado os órgãos públicos a adotarem medidas restritivas quanto ao uso dos recursos naturais. Exigindo uma legislação própria para a adequação de tecnologias visando a preservação e a qualidade ambiental.

A comercialização dos produtos limpos ou orgânicos, vem se deslocando de um mercado onde os consumidores se preocupavam sobretudo com a saúde, para um mercado onde eles tem em mente questões de caráter ambiental
e social. O consumidor tem consciência de que a maior proporção do prêmio que ele paga a mais irá:

- favorecer o meio ambiente,
- chegar diretamente aos produtores rurais,
- contribuir para uma maior equidade sócio econômica (Fairtrade). Pesquisa do Instituto Gallup, publicada no jornal da Agricultura Orgânica, informativo da AAO-SP, Associação de Agricultura Orgânica de São Paulo, ressalta alguns resultados interessantes, sobre o potencial de mercado de produtos orgânicos na capital paulista:

- Cerca de 72% da população da capital paulista aceita pagar 20 a 30% a mais por produtos comprovadamente sem agrotóxicos,
- Mais de 70% da população sabe que consome produtos com agrotóxicos e também de seu efeito nocivo à saúde,
- Mais da metade da população (52%) já tem conhecimento da existência de produtos sem agrotóxicos,
- Sua imensa maioria (90%) sentem-se inseguras e gostaria de dispor de um certificado de garantia da qualidade e procedência dos produtos.

Esses parâmetros mostram o imenso potencial para o mercado de produtos sem agrotóxicos entre os consumidores brasileiros.

No mercado internacional esta realidade ainda é mais expressiva Tem se hoje algo em torno de 17.000 produtores certificados ,distribuídos na Europa (10.000), nos EUA (5.000) e nos outros países2.000). Para o Brasil estima-se 1.000 produtores certificáveis.

Alguns dados sobre a pesquisa de mercado em outros países: O preço é o de menos.

Europa os principais atributos dos produtos alimentícios em %

Atributos	Países do Sul	Países do Norte
Natural	73,1	46,6
Saudável	48,6	73,1
Nutritivo	35,0	26,7
Barato	4,7	9,1
Sem Agrotóxicos	57,6	64,8
Vitaminas e sais minerais	28,1	38,9

Fonte: Boletim do IBD Botucatu / SP

E ainda sobre a influência de garantias ecológicas sobre o desejo de compra:

GARANTIAS ECOLÓGICAS INFLUENCIAM BASTANTE

França Incitação na compra de produtos em %

Características pesquisadas	Percentual
Garantias de higiene e segurança	84
O preço é competitivo	81
O produto é produzido na França	74
O produto porta sinal de qualidade	71
A marca inspira confiança	68
O produto tem garantias ecológicas	64
O produto é fabricado na minha região	59
O fabricante defende causas humanitárias	51
O produto é fabricado na Europa	49

Fonte : IGIA Boletim do IBD Botucatu / SP

POTENCIAL DE MERCADO DE CAFÉS ORGÂNICO E ESPECIAL

O café é a segunda maior commodity. Os cafés especiais, entre eles o orgânico são os únicos produtos que estão com crescimento expressivo em todos os principais consumidores mundiais como é o caso de toda a Europa, América do Norte e Japão. Em todos eles e nos principais países produtores a cafeicultura orgânica é considerada um filão de expressivo valor ambiental, social e econômico. Não existem barreiras para os cafés produzidos sem agrotóxicos e sem afetar o meio.

Para o Brasil é uma ótima oportunidade competitiva de melhorar sua imagem de cafés de qualidade no mercado internacional, oferecendo um produto saudável, que preserva o meio ambiente e de qualidade. ? Há condições de, em um curto período de tempo, oferecer quantidades expressivas de cafés de qualidade com garantias de origem e produtos com certificação para as diversas, exigências do consumidor final.

O mercado interno tem condições de absorver quantidades expressivas destes cafés diferenciados, pois atualmente os valores são muito pequenos diante de um mercado consumidor de 12 milhões de sacas.

Os principais países produtores dos dois tipos de cafés mencionados se encontram na América Central, México, Colômbia, Peru e Equador, sendo que o Brasil ocupa uma posição de pouco destaque, mas com grande potencial de crescimento. ? Os principais países consumidores destes cafés diferenciados continuam entre os que mais consomem o café tradicional como, EUA, Alemanha, Japão, Países Baixos, Suíça, Itália, França, Áustria, Espanha, Canadá, entre outros.

A grande dificuldade de comercialização destes cafés diferenciados é a necessidade de busca de alianças estratégicas, ou seja, encontrar os caminhos de vendas diretas, que são difíceis e trabalhosos. O produtor precisa ter bons contatos, quantidades e qualidades uniformes, grande confiabilidade e ética profissional para atender com presteza os exigentes compradores.

Outra grande dificuldade encontrada é o famoso Custo Brasil, que onera nossa capacidade de exportar. Se for reduzido melhoram-se as condições de concorrer com outros produtores destes cafés.

METAS DOS GRUPOS ENVOLVIDOS NO MERCADO DESTES CAFÉS

Agricultura orgânica não é uma volta ao passado, como muitos afirmam e nem um grupo que repudia a pesquisa tecnológica, ao contrário, precisa-se somar informações e novas tecnologias que visem uma produção mais limpa e projetos que integrem todo ecossistema. Prova disto é o grande passo que já foi dado com a tecnologia do plantio direto; até bem pouco tempo o sistema convencional de plantio era um dogma, e hoje, é uma realidade inclusive para o plantio de café em grandes áreas.

Principais metas:

- conseguir apoio dos órgãos de pesquisa, universidades e entidades para serem desenvolvidos projetos amplos e seguros que dêem suporte e segurança ao produtor, trabalhador rural e consumidor. Isto sem reduzir produtividade e qualidade e que tenham custo de produção acessíveis e renda digna ao produtor.
- buscar o comércio justo, onde o pequeno produtor tenha seus ganhos assegurados, mesmo com pequena produção. É tarefa dos grupos de pesquisa, das associações e do próprio governo criar estratégias que encontrem soluções mercadológicas e estimulem os grupos de pequenos produtores a ter mais acesso a comercialização de café orgânico e especial. E por haver também maior preocupação com meio ambiente neste grupo de agricultores.
- o aprimoramento da certificação e sua adequação às regiões tropicais com suas peculiaridades diferentes das de clima frio é de suma importância para sua aplicabilidade. Pois o consumidor final e o produtor devem ter a tranqüilidade de saber de onde vem e com que garantias ele recebe aquele produto em sua mesa. Não somente garantias de qualidade, mas sociais, da forma de produção e de proteção ao meio ambiente.- fortalecer as associações tanto de pequenos produtores como do produto café. Isto fortalece o setor, aumenta o poder de comercialização e de marketing. Como exemplo, um ano após a fundação da ACOB (Associação de Cafeicultura Orgânico do Brasil) , obteve-se resultados promissores em termos de reconhecimento tanto político quanto comercial, com um pequeno número de associados.
- a filantropia com fins sociais e ecológicos deve ser uma meta importante dos grupos envolvidos com os cafés especial e orgânico, buscando resgatar desastres que danificaram pessoas e o meio ambiente em qualquer parte do nosso planeta.

No Brasil, tanto a produção quanto o consumo destes cafés são muito pequenas, mas com um crescimento expressivo. No caso específico do café orgânico os produtores ligados a ACOB, tem uma produção que representa pouco mais de 0,15% da produção brasileira conforme estimativas de 1999. Mas este crescimento, desde de 1992 é de mais de 100% ao ano. Do ano de 98 para 99 passamos de 22 mil sacas para uma estimativa de 40 mil sacas e de 6 produtores em 97 para 22 em 99.

Apesar deste grande crescimento temos dito:

- O que temos feito em termos de preservação ambiental, de sustentabilidade e de produção de café orgânico é apenas uma gota de água no oceano porém o prazer de se fazer algo pelo nosso ecossistema é imenso e grandemente recompensador.

CONCLUSÃO

Os cafés especial e orgânico não são um modismo que passará, como dizem muitos agourentos e pessimistas, mas sim novos produtos que vieram para ficar, e que ganham mercado a passos largos, onde existem muitas pessoas sérias envolvidas e não somente ecologistas radicais. O mercado consumidor se fortalece em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos, o que não deixa de ser uma forma de transferir riquezas destes países para os menos desenvolvidos, pois os cafés orgânico e especial conseguem um prêmio na sua comercialização. Por ser um produto nobre, não só por suas qualidades, mas também por sua preocupação com o meio ambiente, com o trabalhador rural e com a remuneração justa do produtor, estimula consumidores também preocupados com estas questões sumamente importantes para o nosso bem estar social e ecológico.

CONSULTA BIBLIOGRAFICA

AAO, Jornal da Agricultura Orgânica, Informativo da Associação de Agricultura Orgânica €AAO, diversos. São Paulo - Brasil.

ACOB News, Boletim Informativo da Associação de Cafeicultura Orgânica do Brasil € ACOB, diversos. São Paulo - Brasil

BOLETM AgroEcológico, Informativo da Livraria e Editora AgroEcológica, diversos. Botucatu ,SP - Brasil

PASCHOAL, A . D. Produção Orgânica de Alimentos: agricultura sustentável para os séculos XX E XXI 1 ed.. Piracicaba, SP: ESALQ/ USP, 1994. 191p.

PRIMAVESI, A . M. O Manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais. 4 ed. São Paulo, SP: Nobel, 1982. 541 p.

TEODORO, V.C.de A. & CAIXETA, I.F. Boletim técnico de café orgânico. 1 ed. Lavras, MG: UFLA/ Faepe, 1999. 69 p.

MYCOTOXIGENESIS IN GRAINS APPLICATION TO MYCOTOXIC PREVENTION IN COFFEE

J. Le Bars & P. Le Bars

Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie I.N.R.A. BP 3 , 31931 TOULOUSE Cedex

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi. These toxins are low molecular weight compounds derived from polyketo – acids, terpenes or amino-acids. A toxin can be synthesized by a diversity of fungal species. The term "toxigenic fungal species" means a species for which certain strains can produce, at least under certain conditions, one or several toxic metabolites. Depending on the biology of the fungus and ecological parameters (substrate, hydro-thermic conditions,...), toxigenesis can occur in the field (i.e. alkaloids from endophytic or parasitic fungi) or during periharvest period (i.e. fumonisins from Fusarium moniliforme), or in storage (i.e. aflatoxins from Aspergillus flavus). Moreover, the contaminating toxin can be stable (i.e. aflatoxins, ochratoxins A,...) or instable in certain substrate and / or with thermal treatment (i.e. patulin, citrinin,...). So many parameters have to be considered in the mechanism of a mycototoxic contamination of a commodity.Ochratoxin A, the main reported mycotoxin in green, roasted and soluble coffee, will be discussed all along the chain from the field to the final product, in order to determine, in collaboration with agricultural and technological experts, the moment and the fate of actual contamination and, as a consequence, effective measures for prevention and obtaining end products without mycotoxin.

INTRODUCTION

Numerous fungal species may develop all along the food chain, from the plant in the field, during processing steps and storage, down to consumer's plate or cup. Fungal development in alimentary substrates can lead to several detriment effects: (I) alterations of aspect and technological properties, (II) modification of nutritive value, (III) impairment of organoleptic features, (IV) production of toxic compounds. The present objective is, first, to remind the general main mechanisms and conditions conducive to mycotoxic contamination in order to contribute to a logical prevention. Second, on the basis of data on occasional contamination of coffee, toxin origin, its fate during processing and most probable critical points are discussed.

1. MYCOTOXINS AND MYCOTOXIGENESIS:

1-1. Toxic products resulting from fungal developed in vegetal products

Occurrence of toxic metabolites in foods and feeds resulting from fungal development on plant substrates may result from any of four general mechanisms. Firstly, a saprophyte mould growing on a favorable substrate can directly produce toxic metabolites (e.g. aflatoxins by *Aspergillus flavus*). Secondly, the association of an endophyte with a living plant can lead to toxicosis in animals (e.g. fescue foot disease in cattle with *Neotyphodium coenophialum*). Thirdly, in response to the invasion of phythopathogenic fungi, a living plant can produce diverse metabolites, some of them at levels that are toxic (e.g. ipomeamarone in *Iponiea patatas*). Fourthly, atoxigenic species may contribute by bioconversion to transform atoxic compounds to toxic ones (i.e. dicoumarol in mouldy *Melilotus* forage).(Le Bars and Le Bars, 1996). Only the two first situations correspond to mycotoxins *sensu stricto*, which may be defined as zootoxic metabolits directly produced by micromycetes. They are structural complex, they vary from simple C4-compounds (e.g. tremorgenic mycotoxins) (Steyn, 1980).

1-2. Origin of mycotoxins

Mycotoxins are principally characterized as secondary metabolites. The secondary metabolism comprises biochemical pathways whose terminal synthesis products have no pertinent role for the biology of the organism. In contrast to the primary metabolism, which is fundamentally similar among different living organisms, the secondary metabolism qualitatively depends on the fungal species and quantitatively is often characteristic of each individual strain. In comparison to other organisms, secondary metabolism is very developed in micromycetes and leads to a vast array of molecules (Turner 1971, Turner and Alridge 1983), some of which are toxic to other organisms: bacteria (antibiotics), animals (mycotoxins).

Mycotoxins are elaborated through different metabolic pathways (Steyn, 1980). Polyketides and terpenes are two largest groups (Table 1, Steyn 1998).

Finally, secondary metabolites often are synthesized as families of chemically related products. The type and quantity of molecules produced being largely dependent on the characteristics of the individual strain as well as environmental conditions (nutrients, physic – chemical parameters, biochemical and biological status of the substrate).

So, the term "toxigenic fungal species" generally means a fungal species for which certain strains can produce, at least under certain conditions, one or more toxic metabolites (Le Bars, 1988).

Main mycotoxins and their major fungal sources are presented in the Table 2.

1-3. Factors influencing toxigenesis (Le Bars 1988, 1998)

Conditions permissive to toxigenesis are more limited than those permitting fungal growth. Among the factors leading to the presence of mycotoxins in foods, there are two main categories: intrinsic factors which are dependent on the fungal species or strain and extrinsic factors which depend on environmental conditions.

3.1 *Intrinsic* factors

One mycotoxin is rarely produced by only one species or closely related ones, as it is the case for aflatoxins by *Aspergillus flavus* or *A. parasiticus*, fumonisins by *Fusarium moniliforme* (and related species), sporidesmijns by *Pithomyces chartarum* (Table 2). More frequently, the same toxin can be synthesized by a diversity of fungal species sometimes belonging to different genera: for example, cyclopiazonic acid by *A. flavus* and *P. camemberti*, ochratoxin A (OTA), patulin and penicillic acid by strains of different species of *Aspergillus* and *Penicillium*. Moreover, one fungal species and strain can produce more or less 'simultaneously several mycotoxins: OTA and citrinin by *P. verrucosum*, OTA and penicillic acid by *A. ochraceus*, aflatoxins and cyclopiazonic acid by *A. flavus*, PR toxin, roquefortine, mycophenolic acid and patulcin by *P. roqueforti*.

In contrast, within a particular species reputed to be toxigenic, every strain does not possess this property; the frequency of toxigenic strains being dependent on the species considered and in some cases the region or substrate from which the strain was isolated. Of greater concern than this frequency is the difference in toxigenic potential within a particular species: among isolates from the sames species toxin production can vary by as much as 1000 – fold.

As an overview on the dozen of mold mycotoxin pair we studied, in each case on the basis of 100 to 200 freshly isolated in optimal conditions for each toxigenesis, the four schemes of toxigenic potential distribuition (TPD) were observed:

Biosynthetic Category		Representative mycotoxins
Polyketides	Di-	Monilliformin
	Tetra-	Patulin, penicillic acid
	Penta-	Citrinin, diplosporin, ochratoxins
	Hexa-	Maltoryzine
	Hepta-	Rugulosin, viomellein, viriditoxin, xanthomegnin
	Octa-	Ergochromes, luteoskirin
	Nona-	Citreoviridin, cytochalasin, fumonisins, zearalenone
	Deca-	Aflatoxins, austocystins, erythroskirine
Tetramic acids		Cyclopiazonic acid, tenuazonic acid
Diketopiperazines	Simple	Aspergillic acid, echinulins
	Modified	Brevianamides, fumitremorgens, oxaline, roquefortine, sporidesmins, verruculotoxin
Peptides		Ergotamine, phomopsins , tryptoquivaline
Terpenes	Mono-	Viridicatumtoxin
	Sesqui-	Trichothecenes
	Di-	Aflatrem, penitrems

Table 1: *Mycotoxins as representative of the Main Biosynthetic Categories of secondary metabolites* (Steyn, 1998).

Main mycotoxins	Major toxigenic species
Aflatoxins	*Aspergillus flavus, A. parasiticus*
Cyclopiazonic acid	*A. flavus, Penicillium cyclopium*
Ochratoxin A	*A. ochraceus, P. verrucosum (viridicatum)*
Patulin	*A. clavatus, P. expansum, P. granulatum, Byssochlamys nivea, Paecilomyces varioti, ...*
Sterigmatocystin	*A. versicolor, A. nidulans*
Citrinin	*P. citrinum, P. verrucosum,... Monascus purpureus*
Fumonisins, moniliformine, fusarenon X	*Fusarium moniliforme*
Zearalenone	*F. graminearum, F. culmorum*
Trichothecens:	
T2 toxin, diacetoxyscirpenol,....	*F. sporotrichoïdes, F. poae*
Deoxynivalenol, ...	*F. culmorum, F. graminearum*
Sporidesmins	*Pithomyces chartarum*
Phomopsins	*Phomopsis leptostromiformis*
Ergot alkaloïds	*Claviceps, Neotyphodium coenophialum* *

* Endophyte in *Festuca arundinacea*.

Table 2: *Main mycotoxins (naturally occurring according to substrate, climatic and technological conditions) and their major fungal sources.*

1- Almost 100% toxigenic strains; TPD is close to a normal distribution, inasmuch potential is expressed by the logarithm of the maximal observed concentration of toxin: sterigmatocystin / *A. versicolor*, penicillic acid / *P. verrucosum* cyclopium, cyclopiazonic acid / *P. camemberti*, fumonisin B1 / *F. moniliforme*.

2- A noticeable proportion of non-toxigenic strains (20 to 75%); the other ones presenting a TPD similar as the precending one: aflatoxins and cyclopiazonic acid / *A. flavus*, OTA / *A. ochraceus*, deoxynivalenol and zearalenone / *F. graminearum*.

3- Two clear – cut groups of strains, non toxigenic and highly toxigenic ones: satratoxins / *Stachybotrys atra*, sporidesmins / *Pithomyces chartarum*.

4- Very rare producing strains: fusarochromanone (TDP1) / *F. roseum* (only one strain out of 200).

Specific biological properties of the fungus may determine the moment and the nature of substrate contamination. Certain fungi considered as pathogens develop within the living plant sometimes symptomless and can lead to mycotoxic contamination of end product, i.e. *Fusarium* spp in cereals and their mycotoxins. Other species are occasionally pathogenic on specific substrate, like *P. expansum* on apples conducive to patulin contamination. Other ones are endophytes, strictly associated to a vegetal species, non pathogenic but producing mycotoxins: *Neotyphodium coenophialum* in *Festuca arundinacea*. Other ones present in an opportunist weak pathogenicity: i.e. *A. flavus* penetraing the flower of corn, or invading peanut pod and grains in the field. Lastly, most of the known mycotoxigenic species are only saprophytes. When investigations are undertaken on a toxigenic species or on a mycotoxic contamination, it is important to know (and sometimes to verify) what is such biological situation. Thus, if the mycotoxigenic species is transmited by the seed (i.e. *F. moniliforme*), the first step to limit fumonisin contamination in corn is to use upstream *Fusarium* – free seeds.

3.2 *Extrinsic* factors

Water availability: water activity (aw) influences toxin production considerably, particularly in low hydrated products. Toxigenesis takes place only for aw slightly higher (i.e. + 0,02) than aw limit for growth, which is particular for each fungal species (0,80 for A. flavus, 0,76-0,78 for *A. ochraceus*, 0,85 for numerous Penicillia, 0,90 for

most of Fusaria), and then appers proportional to water availability. For higher aw (i.e. + 0,05), toxin production rate usually increases exponentially with aw in so far as no other limiting factors interferes (oxygen availability, stability of the toxin, other competitive microorganisms,...).

Temperature: the optimal temperature for toxigenesis, defined as the temperature at which the rate of toxin production is maximal, is generally slightly lower than the optimal temperature for growth when the fungus is not in competition with other organisms. The example of *F. moniliforme* and fumonisin B41 is presented in Figure 1.

In addition, the temperature span permissive to significant toxigenesis is narrower than that permitting fungal growth. As an example, the array of favourable and limit hydrotermic conditions for ochratoxin A production is presented in Figure 2.

An along general scheme is observed for stable toxins (most of cited ones in Table 2). For other ones, temperature can also affect stability and therefore toxin accumulation in natural substrates. For example, penicillic acid is produced by numerous species of *Penicillium*, notably *P. verrucossum* var. *cyclopium*, at temperatures ranging from 4°C to 30°C, with the maximal rate of production occurring at about 25°C. However, as the temperature increases the rate at which penicillic acid is coupled to –SH radicals also increases, resulting in actual detoxification. As a result, this toxin usually accumulates at relatively low temperatures at which detoxification is more reduced than toxin production (Le Bars, 1982). The situation is similar for the other mycotoxins such as patulin, citrinin and PR toxin, which are unstable in many artificial and natural substrates. Thus, for these toxins, the hydrothermic span for toxin production is much more restricted than for growth.

Hydro – termic conditions in the field: in general way, a stressed plant is more susceptible to opportunist invasion by fungi and consecutive mycotoxinogenesis. Thus preharvest contamination of peanuts by aflatoxins is a complex situation. Invasion of peanuts by *A. flavus* is related to drought stress and soil temperature in the geocarposphere during the last 50 days before harvest (Sanders et al 1981, Cole et al 1982, Hill et al 1983). Neither elevated temperature alone nor drought stress alone causes aflatoxin contamination in sound mature kernels (SMK). The mean thres hold geocarposphere temperature required for toxin development during the latter part of the peanut growth cycle is 25-27°C. Aflatoxin was absent from irrigated plots, from drought stressed plots with cooled soil, and from irrigated plots with heated soil, and was present in drought stressed SMK (Hill et al, 1983). Morever, drought conditions favor insects proliferation which increases fungal and subsequent toxin contamination (see below). This is an example of the multifactorial situation leading to mycotoxic contamination.

Gazeous composition: the reduction of partial pressure of oxygen and above all the rise of carbon dioxyde level have a depressive effect that is much greater on toxigenesis than on growth. Aflatoxins production is moderately reduced between 21 and 5% oxygen, but is practically inhibited only when the oxygen concentration is below 1%. An increase in CO2 level provokes a large drop in aflatoxin formation (Diener and Davis, 1977). In atmosphere enriched with CO2, ochratoxin A production is reduced when the O2 concentration is below 20% (Paster et al, 1983).

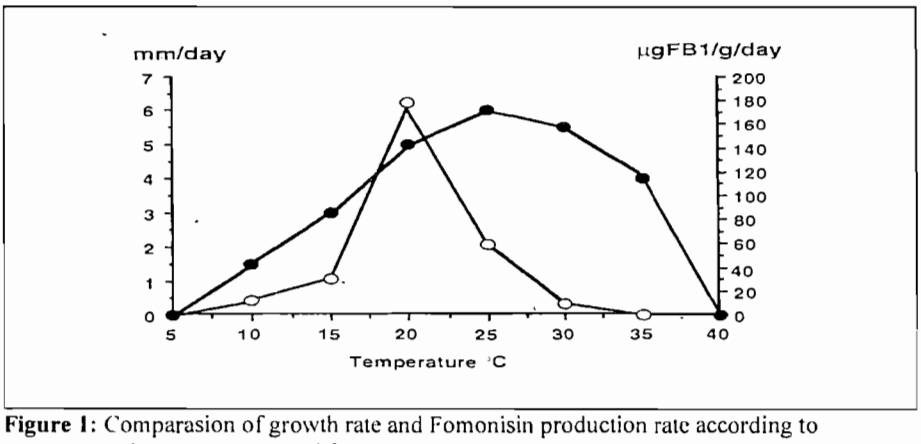


Figure 1: Comparasion of growth rate and Fomonisin production rate according to temperature for *Fusarium moniliforme*(Le Bars et al., 1995)

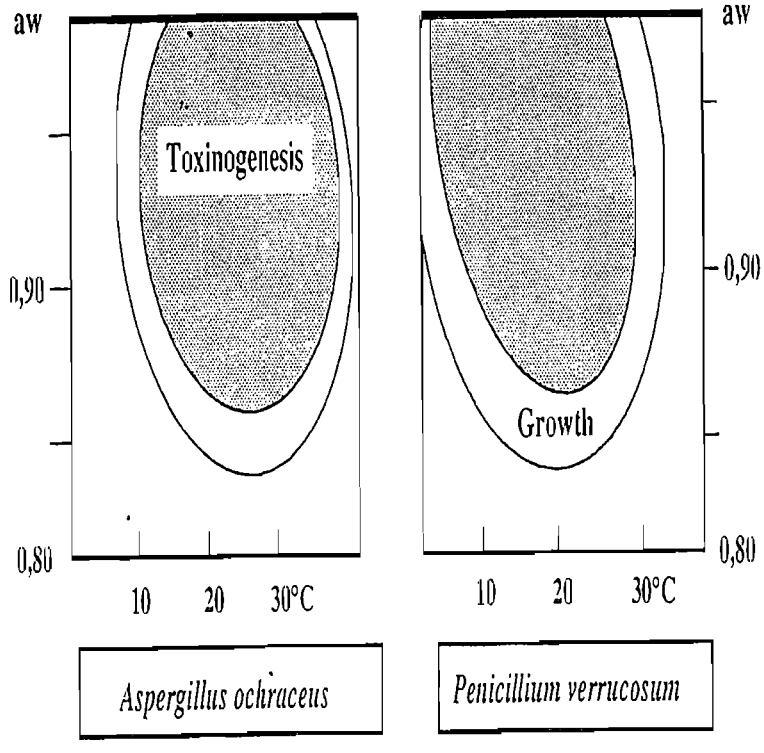


Figura 2: Favorable and limit hydrothermic conditions for growth and ochratoxin A production by *A. ochraceus* and *P. verrucosum* (from Nofgholt et al., 1979)

Fumonisin is drastically reduced by a slightly confined air (Le Bars et al, 1994). On the contrary, *Byssochlamys nivea* can produce patulin even in anaerobic conditions (Escoula et Le Bars, 1975). After airtight storage, in which molds can more or less develop, the introduction of fresh air or ventilation rapidly provoques intense toxigenesis.

Nature of the substrate: toxigenesis, at least for most of the know mycotoxins , is much more dependent on the chemical composition of the substrate than fungal growth. In particular, an elevation of carbohydrates and/or lipids is favourable for toxigenesis. For each fungus-mycotoxin pair, we have searched for the optimal culture medium for toxin production with the aim of purification and crystallization on the gram level. By varying (factorial plans) the culture composition, in particular the percentages of saccharose and yeast extract, it has been found that for a dozen different fungus-toxin pairs studied the most favorable conditions for toxin production generally comprised 16% saccharose for 1-2% yeast extract. Similar results are seen for *in vitro* toxigenesis on a natural substrate: cereals and oleaginous seeds are generally more favorable for toxigenesis than are high-protein substrates. In addition, it is important to consider the substrate/temperature interaction which is involved in the stability of certain mycotoxins (see *supra*).

Biological factors: insects and mites are vectors for spores of molds which they introduce into the grains or the fruits by the lesions they generate. The contamination of peanut (Aucamp 1969), cotton (Ashworth et al 1971), maize (Widstrom et al 1976) by *A. flavus* or aflatoxins before harvest is often linked to attack by insects. During

storage, the determining effect of weevils on aflatoxin contamination of corn was clearly demostrated by Beti et al (1995). More recently, the role of coffee berry borer (*Hypotenemus hampei*) as vector of *A. ochraceus* was observed by Vega and Mercadier (1998) in Uganda and Benin. Among other biological factors, there are: - more less specific relations between plant and fungus (cf § I –3.1); evolution of fungal population during storage, from xerophilic species to more hydrophilic ones.

	Number of samples	Range (ng/g)	Mean (ng/g)	Authors
Roast and ground coffee	113	n.d - 7.8	0.9	Studer-Rohr et al 1995 + in V.d. Stegen 1997 (MAAF 1995, Koch 1996, Maierhofer 1995)
	484	n.d - 8,.2	0.8	V.d. Stegen et al, 1997
	20	0.2 - 2.1	0.6	Patel et al, 1997
Instant coffee	149	n.d - 27.2	1.3	V.d. Stegen et al , 1997
	80	0.1 - 8.0	1.0	Patel et al, 1997

Table 3 : *Natural occurrence of ochratoxin A in roast and ground, and instant coffee.*

2- GENERAL DATA MYCOTOXIC SITUATION IN COFFEE:

The main know mycotoxic contamination in coffee is ochratoxin A (OTA). Let us first remind some data on risk assessment, second consider toxin origin and its fate during processing, third examine the critical points for prevention.

2-1. Risk assessment:

Natural occurrence: OTA was first reported in green coffee in 1974 by Levi et al. Then it was generally accepted thatOTA was found in commercial roast coffee and in coffee brews (Tsubouchi et al, 1988). More recent surveys on 633 samples from different European countries (Van der Stegen et al, 1997) and in UK retail coffees (Patel et al, 1997) allowed evaluation of distribuition and mean level of natural contamination in the final product (Table 3).

Toxicological data: Animal studies have shown OTA to be a potent nephrotoxin, immune suppressant, tetratogen and foetoxic agent (IARC, 1993). The World Health Organization / Food and Agricultural Organization Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) has considered the toxicity of OTA and has set a Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) for OTA of 100 ng/kg body weight (WHO, 1996).On the hard, on the basis of recent surveys (Van der Stegen et al 1997, Patel et al 1997), the mean intakes of OTA (from consuming 4 cups of coffee daily) would be about 2,4 ng/kg body weight./week, that is to say about 2% of PTWI proposed by JECFA for OTA (Walker, 1997). Despite this reassuring element of risk assessment, evidently an effort has to be made to reduce mycotoxin contamination level.

2-2. Toxin origin and its fate during processing:

Biological origin: there two major AO producing moulds: *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* (the group of chemotype producing AO was subsequently shown to fit the description

of *P. verrucosum*; Frisvad 1984, Pitt 1987, Moss 1996). They differ somewhat in their hydrotermic requirements (Northolt et al 1979, Ramos et al 1998). The minimal Aw for growth of *A. ochraceous* is 0,76 and 0,81 for *P. verrucossum*, but the minimal Aw for growth of *A. ochraceous* is 0,76 and 0,81 for *P. verrucosum*, but the minimum for AO production is 0,85 for both organisms. The temperature range is 10-37°C (optimum 25-30°C) for *A. ochraceus* and 4-30° for *P. verrucosum* (Figure 2). Such respective ecological characteres explains, at least partially, the fact that the former one is associated with OA contamination in warm countries, and the second one in cooler ones (Danmark,...).

Fate during processing and brewing: inconsistent results have been published regarding the influence of roasting on the OTA content in roasted beans and the transfer into the coffee brew. This would be due to the high inhomogeneity of the OTA contamination within one sample (Studer-Rohr et al 1995, Blanc et al 1998), a general problem encountered with mycotoxins in grains and fruits.
Studer-Rohr et al (1995) observed that in naturally contaminated samples no statistically significant difference between OTA content of the green and roasted beans was found. However, in artificially inoculated samples, much more homogeneously contaminated, loss of OTA was estimated from 2 to 29%. More recently, after analysis of OTA distribuition in a naturally contaminated green coffee lot, Blanc et al (1998) obtained a slight elimination of toxin during green coffee cleaning. But the roast and ground coffee contained only 16% of OTA originally present: this reduction is mostly due to thermal degradation (less than 20% accounted by the chaff). Such a result, obtained with a roasting cycle of 14 mn and a final temperature 223°C, is consistent with the thermostability data of OTA in a dry substrate: half-life times of 12 and 6 min respectively at 200 and 250°C (Boudra et al, 1995).
In the brewing methods frequently used, 70% to almost complete extraction of OTA occus (Studer-Rohr et al 1995, Viani 1996, Van der Sregen et al 1997, Blanc et al 1998).
Taking into account this partial stability (and transfer to the brew) during processing, decrease of contamination frequency and level in the end product is based on prevention of ochratoxigenesis upstream.

2.3. Most probable critical points:
Taking in account the preceding data, let us examine the three major possible periods for fungal infection and toxigenesis: in the orchard, during harvesting processing drying, and storage.

The orchard: the ochratoxigenic fungal species are not phytopathogens nor endophytes, so direct internal infection of the fruit from the tree is not possible. They are opportunist saprophytes. So general prevention, all along the chain, would be logically based on: avoiding fungal spores sources, limiting open entries into the fruit, reducing, after ripeness, water availability as soon as possible.
In a orchard, clearing away decaying organic material, particularly fallen damaged fruits, actually contributes to reduce fungal spores sources.

Healthy plant predispose to healthy fruits.
On tree infection occurs due to inoculated spores by insects or airbone spores penetrating into the pulp or seed through skin lesions such drought lacerations, insect damages or splitting berries consecutively to rain during fruit ripening stage, similarly as for *A. flavus* infection in figs (Boudra et al, 1994). Actually, partial studies on sound, over ripe, sun scorched and split fruits on the plant indicated that *Aspergillus* and *Penicillium* populations were comparatively high in split fruits (Naidu et al, 1997). Unfortunately complete identification of species nor mycotoxin analysis were not reported. Moreover, in Uganda and Benin, 5 to 17% of adults coffee berry border emerging from the beans were infected by A. ochraceous (Veja and Mercadier, 1998). These authors consider that its potential to serve as a vector for this cosmopolitan fungus is high.
It would be very important to examine when and how the fungus colonizes the pulp and the beans by mycological and histological techniques (passive or active penetration?) and the delay and localization of toxigenesis (in the beans or diffusion of the toxin from the pulp?), because we have found different mechanisms in each commodity (figs, walnuts, grains...) leading to practical different means for prevention.

Harvest-Processing-Drying: as a result of more than thirty years studies on mechanisms of mycotoxic contamination of different grains, fruits, forages and their prevention, we consider that this "pre-harvest period" (Le Bars et al, 1994) comprises frequently the most critical steps or points.
Maturity state at harvest, particularly for fruits, determines greatly the risk of physical lesions and consecutive fungal contamination (Bouda et al, 1994). The best compromise results from a close

cooperation with the specialists of the commodity. Freshly fallen berries, insect damaged and split fruits have to be collected separately and dried without delay. May be, as for other commodities, mats under the tress would reduce fungal infection of the fruits from the soil.

For most of grains and fruits, the intermediary post-harvest period before drying (or other stabilization procedures) has to be as short as possible. Sometimes, when drying process is delayed or transport is long, volatile fungistatics may be used to prevent fungal development easily detected by self heating). The effects of main parameters, along wet or dry processing of coffee, on molds and mycotoxins contamination have to be studied. Such research is difficult because many parameters, variable in time and space, interfer. Usually fruitfull investigations comprise two approaches: na analytical one on models, a synthetic one on pilot scale. They require a very close collaboration between complementary partners (mycologists, technologists, analysts,...).

At each step, it is beneficent to sort out foreign material and damaged berries or grains.

Drying should be done as soon as possible to minimize the three main parameters (duration, free water, temperature) effects. For certain commodities, when drying equipment is temporarily insufficient, it is sometimes performed in two steps: a first one to decrease without delay moisture content to about 20%, followed by a slightly delayed one to obtain a water content allowing safe storage.

Storage: during storage, a commodity is somewhat in equilibrium with interparticular water vapor. So the notion of Equilibrium Relative Humidity (ERH%) or water activity (Aw) may be used as a determinant parameter for fungal development initiation. The Aw limit for initial growth of *A ochraceus* is 0,76, which corresponds to 14,2% moisture content (MC) on wet weight basis (w.b.) for green coffee beans (Figure 3).

They are respectively 0,81 and 15,5% MC (w.b.) for *P. verrucosum*. But, for several months storage, to avoid any fungal evolution (starting by xerophilous species as *A. glaucus* group conducing with time to more hydrophilous ones including toxigenic spacies), it is recommended to store grains at a maximal 0,65 Aw, corresponding to 11,8% MC (w.b.) for green coffee (Figure 3).During experimentation on long term storage (8 months) of green coffee under topical climate and in different industrial conditions, the average data on MC and Aw fit the predictive model relatively well (Bucheli et al, 1998). The storage conditions was 13,5% MC (dry basis, ca 11,8 MC w.b.) and 71% ERH: in no cases, increase in OTA amount was observed (average OTA of 3,9 µg/kg at the beginning of storage). Microbiological evaluation and OTA data during different industrial storage conditions in this study favor the idea that OTA contamination, as frequently for numerous other mycotoxins in grains and fruits, occurs in the course of steps before storage.

For long term storage of a lot, homogeneity in the physico-chemical characteristics of the commodity and in the hydro-thermic conditions are highly recommended. When storage of a insufficient dry product goes wrong it is typically due to heterogeneous conditions: local differences in temperature in a lot (i.e. because sunny side) leads to vapor migration and initiation of fungal development (for example, for a 10° difference between silo sides, the safe storage period of compound feeds for animals is divided by two).

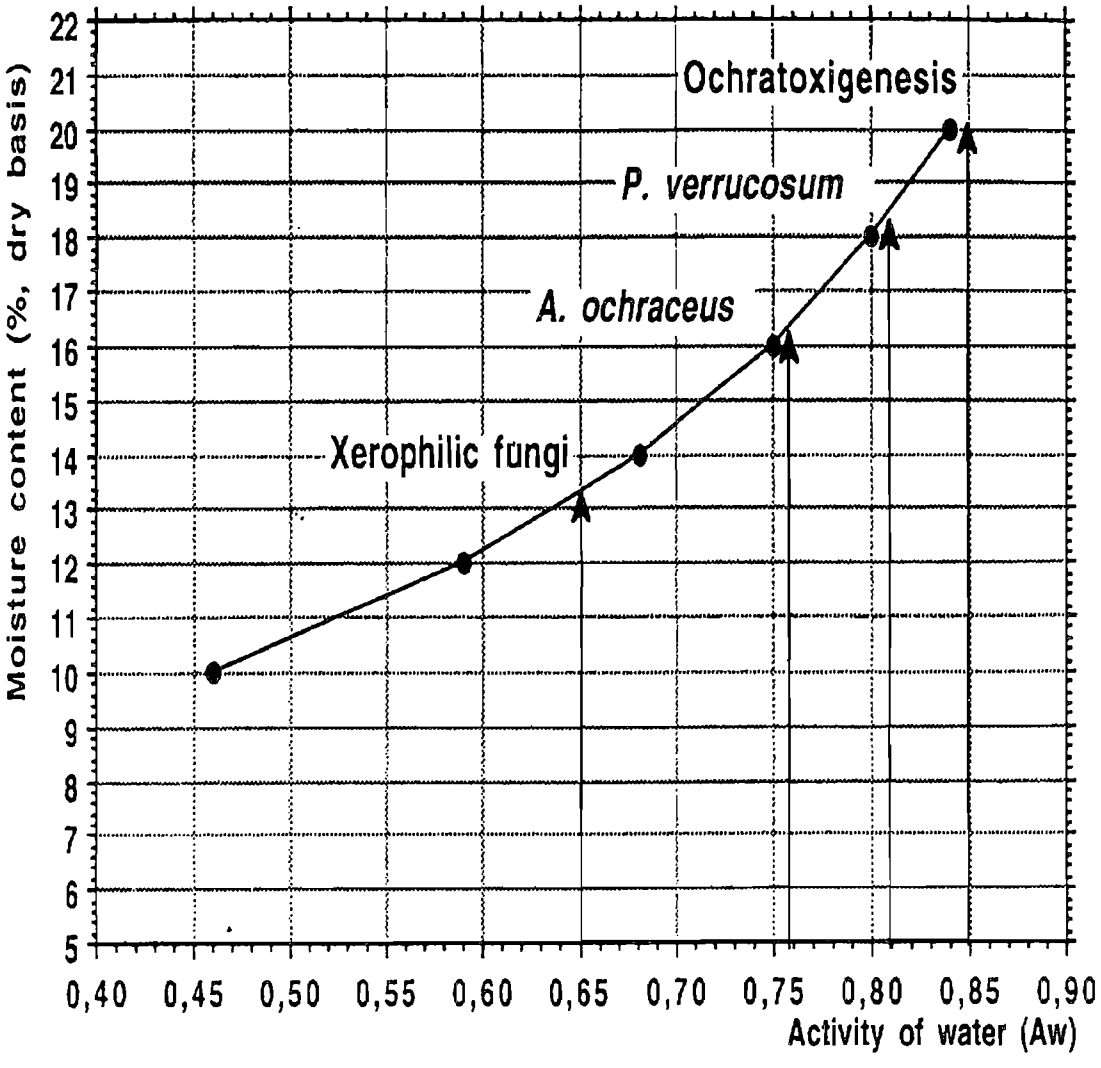


Figure 3: Sorption curve of green coffee (robusta and arabica, 30°C from Bucheli et al., 1988), and minimal Aw and moisture content for fungal growth and toxigenesis.

3.CONCLUSION

There are a lot of possible mycotoxic contamination in alimentary products. In each case, biological, technological and environmental conditions are different. So, a reasoned prevention on a speciffic problem is based on understanding the mechanisms of contamination and on determination of the main parameters. In the particular case of ochratoxin in green coffee, main critical steps are upstream: harvesting and sorting, separation of tissues and drying, storage and transport. Mycological studies all along these steps are necessary: among fungal contaminations of this commodity, is *A. ochraceous* the alone ochratoxigenic species? Where, when and how does it develop and produce ochratoxin A? Anyway, decrease of fungal development would lead not only to improve hygienic quality of coffee but also maintain organoleptic features, the main value of this commodity.

4. REFERENCES

Ashworth L.J., RE. Rice, JL. Mc Means, G.M. Brown, 1971. The relationship of insects to infection of cotton balls by *Aspergillus f/a vus. PhytopaThology,* 61, 488-493.

Aucamp J.L., 1969. The role of mite vectors in the development of aflatoxin in groundnuts. *J Stored Prod. Res.*, **5,** 245-249.

Beti J.A.. Phillips T.W.. Smalley EU., 1995. Effects of maize weevils on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. *J. Econ. Entomol,* 88, 1776-1782.

Blanc M., A. Pittet, R. Munoz-box, R. Viani, 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *J Agric. Food Chem.,* **46,**673-675.

Boudra H., J. Le Ears, P. Le Ears, J. Dupuy, 1994. Time of *Aspergillus flavus* infection and aftatoxin formation in ropening of figs. *Mycopathologia,* **127.** 29-33.

Boudra H., P. Le Bars, .1. Le Bars, 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. Appl. Environ. Microbiol., 61, 1156-1156.

Bucheli P., I. Meyer, A. Pittet, G. Vuataz, H. Vian~, 1998. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *J. Agric. Food Chem.,* 46, 4507-4511.

Cole R.J.. PA. Hill, PD. Blankenship, T.H. Sanders, K.H. Garren, 1982. Influence of irrigation and drought stress on invasion by *Aspergillus f/a vus* of corn kernels and peanut pods. *0ev IncA Microtiot,* **23,** 229-236.

Diener UL., N.D. Davis, 1977. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus. Agric. Exp. Sta.,* Auburn Univ., Bull. n°493.

Escoula L., '1. Le Bars, 1975. Production de patuline par *Byssochlamys nivea* sur un modèle densilage. *Ann. Rech. Vet.,* 6. 219-226.

Frisvad J.C., 1984. Expression of secondary metabolism as fondamental characters in *Penicillium* taxonomy. In Toxigenic Fungi, ed. H. Kurata and Y. Ueno, Elsevier, Amsterdam, 98-106.

Hill RA., PD. Blankenship, R.J. Cole, Tb. Sanders, 1983. The effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by *Aspergilfus flavus* and subsequent aflatoxin development. *Appt Environ. Microbiol.,* **45,** 628-633.

ARC, 1993. Ochratoxin A. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Lyon: Internat. Agency Research Cancer), 489-521.

Le Bars J., 1982. Facteurs de 'accumulation dacide p~nicillique dans les denrdes dorigine vdg6tale. *SoL Ailments,* 2 (h.s II), 29-33.

Le Bars J., 1988.Toxigenesis as a fonction of the ecological conditions of the grain/microorganisms system. *In* "Preservation and storage of grains, seeds and their by-products", J.LMULTON, Lavoisier pub. New York, Paris, 347-366.

Le Bars U., 1990. Contribution to a practical strategy for preventing aflatoxin contamination of dried figs. *Microbiologie- Ailment -Nutrition,* 8, 265-270.

Le Bars J.. P. Le Bars. J. Dupuy, H. Boudra, 1994. Biotic and abiotic factors in Fumonisin Bi production and stability. *J.A.O.A.C InternaL,* **77,** 517-521.

Le Bars P., J. Le Bars, 1995. Ecotoxinog6n6se du *Fusarium mon//itorme.* Enveloppe des risques des Fumonisines. *Crytogamie- %4ycofoc.'ie.* 16, 59-64.

Le Bars J., P. Le Bars, 1996. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Vet. Res..* 27, 383-394.

Le 8ars U,, P. Le Bars, 1998. strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. *Vet, Res,,* 149, 493-500.

Levi C., H.L. Trenk. H.K. Mohr, 1974, Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *JA. CA. C.,* **57, 866-870.**

Moss MO.. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Add. Coot,* 13, (suppl). **5-9.**

Naidu R., S Daivasikamani J.S. Nagaraj, 1997. Current status and strategies for management of mycotoxins in India coffeesln 17th Coll. Scientif. sur le caf6, ASIC (ed), Nairobi. 20-25 /07/1 997, p. 69-78.

Northolt M.D., H.P. Van Egmond, WE. Paulsch, 1979; Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *JL Food Protection* , 42, 485-490.

Faster N., N. Lisker, I. Chei, 1983. Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* grown under controlled atmospheres. *Appi. Environ. Microbiot* **45, 1136-1139.**

Patel S., CM. Hazel, A.C.M Winterton, A.E. Gleadle, 1997. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Add.Cont,* **14, 217-222.**

Pitt. J.l., 1937. Penicillium viridica turn, *F. verrucosum,* and the production of ochratoxin A. *AppL Environ. Microbiot,* 53, 266-269.

28. Ramos A.J., N. Labernia, S. Mann, V. Sanchis, N. Magan, 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *Int. J. Food microbioL, 44,* 133-140.

29. Sanders T.H., R.A. Hill, R.J. Cole, P.D. Blankenship, 1981. Effect of drought on occurrence of *Aspergillus flavus* in maturing peanuts. *J Am. OIL Cem. Soc..* 58, 9661 -9670.

30. Steyn P.S. 1980.The biosynthesis of mycotoxins , 432 pages, Acad. Press.

31. Steyn P.S., 1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.*, 149,469-478.
32 Studer-Rohr J , D R. Dretrich, J. Schlatter, C. Schlatter,1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. Fd. Chem. Toxicol., 33, 341-355.
33. Tsubouchi H., H. Terada. K. Yamamoto. K. Hisada, Y. Salabe, 1938. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *I Agric. Food Chem.*, 36, 540-542.
34. Turner W.B. 1971. Fungal metabobtes. 426 pages, Aced. Press, London.
35. Turner WE. And Alridge D.C. 1983. Fungal metabolites II, 631 pages, Acad. Press, London.
36. Van der Stegen G., U. Jorissen, A. Pittet, M. Saccon, W. Steiner, M. Vincenzi. M. Vinkler, J. Zapp, C. Schiatter, 1997. Screning of Europeen coffee final products for occurrence of ochratoxin A. *Food Add.Cont,* 14, 211-216.
37. *Vega* FE., 2. Mercadier, 1998. Insects, coffee and ochnatoxin A. *Florida Entomologist,* 81, 543-544.
38. Viani R., 1996. Fate of ochnatoxin A during processing of coffee. *Food Add. Coot.* 13, (suppl), 29-33.
39. Walker P., 1997. Quality and safety of coffee. 17 th Coil. Scient,
cafd. ASIC Internat. sur le (Nairobi 1997), .51-60.
40. Widstrom NW., EB. Lillehoj, AN. Sparks, WE. Kwolek. 1976. Corn damage and aflatoxin on corn ears protected with insecticide. *I Loon. Entornot.* 69, 677-679.
41. World Health Organisation, 1996. Evaluation of certain food additives and contaminants. 44th Report of JECFA. WHO Technical Report series n.°859(Geneva).

OCRATOXINAS E AFLATOXINAS EM CAFÉ BRASILEIRO

Lucia Valente Soares

Professora Livre Docente da Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Caixa Postal 6121, 13081-970 Campinas, S.P.

INTRODUÇÃO

Fungos ou bolores tem sido amplamente usados pela humanidade na produção e preservação de alimentos, produção de matéria prima e medicamentos. Porém, como uma conseqüência da luta pela sobrevivência dos fungos em seu microambiente, substâncias tóxicas são por eles produzidas e algumas delas altamente tóxicas ao homem e aos animais. São as micotoxinas. Dentre estas, a ocratoxina A e as aflatoxinas tem sido encontradas em café (Levi, 1980; Nakajima et al, 1997; Micco et al., 1989). Organismos internacionais como o Codex Alimentarius tem discutido a possibilidade de sugerir limites para ocratoxina A em café (Codex Alimentarius, 1998). A Itália adotou, desde 1996, o limite de 4 ng/g de ocratoxina A para café verde (Ministerio delle Finanze, Itália, 1996).

O Brasil como grande produtor de café é especialmente afetado por estas descobertas, tanto a nível de saúde pública pelo alto consumo da bebida dentre sua população, como a nível de comércio exterior no qual o café representa um ítem importante. Torna-se assim importante uma análise do assunto para que possamos nos situar e visualizar os caminhos a tomar diante do problema.

UM POUCO SOBRE AS TOXINAS

As ocratoxinas são produzidas principalmente por cepas de *Penicillium verrucosum* e de várias espécies de *Aspergillus*, entre estas *A. ochraceus*. As evidências atuais indicam que *P. verrucosum* é encontrado em climas temperados e *A. ochraceus* em climas quentes. Estas toxinas compreendem uma família de 7 compostos porém, apenas a ocratoxina A tem sido encontrada como contaminante importante em alimentos (Moss, 1996).

A ocratoxina A é agudamente tóxica para pássaros, mamíferos e peixes. Seu alvo principal são os rins e secundariamente, o fígado. É também imunotóxica e teratogênica (Busby e Wogan, 1981). A "International Agency for Research on Cancer" classificou a ocratoxina A no grupo 2B de substâncias, o que significa que há evidência suficiente de sua carcinogenicidade em animais, permitindo classifica-la como possivelmente carcinogênica para humanos (IARC, 1993). Ainda em humanos, a ocratoxina A tem sido correlacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins observada na população desta região e que em casos extremos leva à morte (Plestina, 1996). Mais recentemente, nefropatias tem sido relatadas na Algéria e na Tunísia e a toxina tem sido encontrada em fluídos corpóreos da população afetada (Creppy et al., 1993). A meia vida da ocratoxina A no organismo humano foi estimada em 35 dias (Schlatter, 1996). Na União Europeia e na América do Norte há indicações que os alimentos mais frequentemente contaminados com ocratoxina A são alguns cereais e produtos à base de carne e vísceras de suínos. Atualmente vinho, cerveja e café estão sendo examinados como possível fonte de contaminação (Kuiper-Goodman, 1996). Dentre os cereais, a cevada é o mais frequentemente contaminado, seguida por centeio e aveia (Pohland et al., 1992).

As aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 são metabólitos dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. São altamente tóxicas para mamíferos, primatas não humanos, aves e peixes. Seu alvo principal é o fígado. São também teratogênicas, mutagênicas e a aflatoxina B_1 está entre os compostos carcinogênicos mais potentes conhecidos (Busby e Wogan, 1981). A "International Agency for Research on Cancer" classificou a aflatoxina B_1 como um carcinógeno humano (Grupo 1) (IARC, 1993). As aflatoxinas tem sido encontradas em diversos tipos de alimentos, principalmente amendoim, alguns tipos de nozes e castanhas, semente de algodão, milho e figos. Não há dados em humanos quanto à persistência da aflatoxina no organismo. Em macacos a maior parte da toxina é eliminada em 2 – 3 dias via urina e fezes. O fígado porém retém cerca de 1% e resíduos são ainda detectados na urina 5 semanas após a ingestão da toxina (Busby e Wogan, 1981).

PRODUÇÃO E ESTABILIDADE DA OCRATOXINA A E DA AFLATOXINA B_1

A presença de *A. ochraceus* e ocratoxina A em café foi primeiro relatada em 1974 (Levi et al., 1974). Mais adiante, a microbiota fúngica de 944 amostras de café verde importada pelos EUA foi

examinada e os autores do trabalho relataram uma invasão interna de 80,5% das amostras asiáticas e africanas contra 49,4% das amostras das Américas Central e do Sul. O gênero *Aspergillus* predominou e incluiu espécies toxigênicas como *A. ochraceus*, *A. flavus* e *A. versicolor*. O gênero *Aspergillus* foi também encontrado e incluiu espécies toxingênicas como *P. cyclopium*, *P. citrinum* e *P. expansum* (Mislivec et al., 1983). Estes estudos alertaram para a possibilidade do café conter micotoxinas.

Em meios sintéticos, o *A. ochraceus* apresenta uma temperatura ótima de produção de 25 °C. A faixa de temperaturas em que ocorre produção é 12 – 37 °C. A atividade de água ótima para produção da toxina é acima de 0,97 e a mínima é 0.79 (Moss, 1996). Porém, os dados atualmente existentes sobre as condições para produção de ocratoxina A em café são extremamente pobres. Em um trabalho recente, realizado na Tailândia, acompanhou-se por 8 meses o armazenamento de café em silos com aeração, sem aeração e com ar condicionado e ainda em sacas em armazéns. Foi constatado que não houve produção da toxina durante o armazenamento. Parte do café já continha ocratoxina A e os níveis não aumentaram durante os meses de estocagem. Concluíram os autores que a produção da toxina ocorreu antes do armazenamento (Bucheli et al., 1998). A passagem da maior parte da toxina presente no café torrado para a bebida durante sua preparação (Tsubouchi et al., 1987; Blanc et al., 1998) tem sido motivo de preocupação. Olhou-se então para os efeitos da torrefação como uma possibilidade de redução do teor da toxina. A termoestabilidade da ocratoxina A foi estudada em trigo a diferentes temperaturas. A 200°C houve uma destruição de 50% com 12 minutos em trigo seco e 19 minutos em trigo molhado. A 250 °C e em trigo seco, conseguiram os autores a eliminação de 50% da toxina em 6 minutos. A toxicidade dos produtos de degradação não foi verificada (Boudra et al., 1995). São resultados que apontam uma estabilidade térmica relativamente alta para a ocratoxina A. Em café, existem controvérsias sobre o efeito da torrefação como possível meio de eliminação da toxina. Por um lado, há trabalhos que apontam destruição da maior parte da toxina, de 80% ou mais, e outros que descrevem a torrefação como pouco eficiente, capaz de reduzir a toxina em apenas 12% ou menos (Levi et al, 1974; Cantàfora et al., 1983; Tsubouchi et al., 1987; Studer-Rohr et al., 1995; Blanc et al., 1998).

Não há relatos sobre condições para produção de aflatoxinas em café. *A.flavus* pode produzir aflatoxinas entre 12 – 42 °C. As temperaturas ótimas estão no entanto entre 28 e 30°C. Em amendoim a produção de aflatoxinas atinge o máximo entre 15 e 35 % de umidade (Rustom, 1997). Não há também estudos que verifiquem se as aflatoxinas passam para a bebida durante o seu preparo. Apenas dois trabalhos tentaram determinar a destruição da aflatoxina B_1 com a torrefação. Ambos afirmam haver uma destruição de 80 – 99% da toxina (Levi, 1974; Micco et al., 1992).

INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A E AFLATOXINAS EM CAFÉ

Levantamentos sobre a incidência de ocratoxina A em café na literatura científica, são relativamente poucos e na sua maioria recentes. Na Tabela 1 temos um resumo dos levantamentos realizados em diferentes países em amostras de café verde, torrado e solúvel. Levantamentos sobre a incidência de aflatoxinas em café são ainda mais raros(Tabela 2.)

Tabela 1. Níveis de ocratoxina A encontrados por países importadores em café procedente de várias partes do mundo.

Tipo de café	Procedência	Amostras		Faixa	Média	Referência
		Total	Contaminadas	(µg/kg)	(µg/kg)	
Verde	Diversa	29	17	0.2 - 15.0	3.1	Micco et al., 1989.
Verde	Diversa	47	14	0.2 - 17.4	2.6	Nakajima et al., 1997
Verde	Am. do Sul	19	9	0,1 - 4.6	1.4	Trucksess et al.,1999
Torrado	Diversa	40	14	0.4- 4.2	1.2	Studer-Rohr et al., 1995.
Torrado	Diversa	11	11	≤ 3.2	0.51	Jorgensen et al., 1997
Torrado	Diversa	484		≤ 8.2	0.8	Stegen et al., 1997
Torrado	Diversa	20	17	≤ 2.1	0.6	Patel et al., 1997
Torrado	Am. do Sul	13	9	0,1 - 1.2	0.4	Trucksess et al., 1999
Solúvel	Diversa	101	75	≤ 6.5	1.0	Pittet et al., 1996.
Solúvel	Diversa	80	64	≤ 8.0	1.0	Patel et al., 1997
Solúvel	Diversa	149		≤ 7.8	1.3	Stegen et al., 1997

Tabela 2. Níveis de aflatoxina B_1 encontrados por países importadores em café procedente de várias partes do mundo.

Tipo de café	Procedência	Amostras		Faixa	Média	Referência
		Total	Contaminadas	(μg/kg)	(μg/kg)	
Verde	Diversa	47	14	2,0- 32,9	7,8	Nakajima et al., 1997.
Verde	Diversa	1365	2	3 - 12		Levi, 1980.

Quando na faixa de contaminação é indicado um valor inferior, significa que a média refere-se apenas às amostras contaminadas. Quando não há indicação de valor inferior, a média foi calculada incluindo todas as amostras (contaminadas e não contaminadas).

OCRATOXINA A E AFLATOXINA B_1 EM CAFÉ BRASILEIRO

Os dados, ainda que parcos, sobre café verde brasileiro analisado pelos países compradores, mostram uma situação bastante favorável, com poucas amostras contaminadas e teores baixos de ocratoxina A (Tabela 3). O mesmo ocorre com relação à aflatoxina B_1 (Tabela 4).

Os dados colhidos na UNICAMP (Tabela 5) mostram uma contaminação média de 2,4 μg/kg de ocratoxina A em 142 amostras de café verde. Este valor está dentro dos encontrados por levantamentos realizados por países importadores em amostras de café provenientes de diversas partes do mundo (Tabela 1). A incidência de amostras contaminadas no levantamento da UNICAMP foi de 21% e compara favoravelmente com os dados da Tabela 1 para café verde, onde incidências de 30%, 47% e 59% são relatadas (Nakajima et al., 1997; Trucksess et al., 1999; Micco et al., 1989).

Trabalho realizado por Furlani (1998) e Leoni (1999) através de cooperação entre a UNICAMP e a Cia. Cacique Café Solúvel. As amostras correspondem a café ofertado no comércio e não tem relação com café adquirido pela Cacique para sua produção de café solúvel. As amostras de *C. arabica* procediam dos estados de Minas Gerais, Paraná, Espirito Santo, São Paulo e Bahia e as amostras de *C. canephora*, dos estados de Espirito Santo, Bahia e Rondônia.

Tabela 3. Níveis de ocratoxina A encontrados em café procedente do Brasil por países importadores

Tipo de café	Amostras		Faixa	Média	Referência
	Total	Contaminadas	(μg/kg)	(μg/kg)	
Verde	8	0			Cantáfora et al., 1983
Torrado	9	0			Tsubouchi et al., 1988
Verde	14	10	0,2 – 5,5	2,0	Micco et al. 1989
Verde	10	0			Nakajima et al., 1997

Tabela 4. Níveis de aflatoxina B_1 encontrados em café procedente do Brasil por países importadores

Tipo de café	Amostras		Presença de *A. flavus*	Referência
	Total	Contaminadas		
Verde	9	0	1	Nakajima et al., 1997.

Tabela 5. Níveis de ocratoxina A em amostras de café verde brasileiro oferecido no mercado interno nos anos de 1997 e 1998.

	Amostras			Média (μg/kg)	
Espécie contaminadas	Total	Contaminadas	Faixa (μg/kg)	do total	das
C. arabica	119	27	≤47,8	1,9	8,4
C. canephora	23	3	≤114,2	5,3	40,4
Total	142	30	≤114,2	2,4	11,6

IMPACTO DO CAFÉ NA INGESTÃO DE OCRATOXINA A ATRAVÉS DA DIETA

Em 1995, o JECFA (Joint Expert FAO/WHO Committee on Food Addtives) avaliou a ocratoxina A e estabeleceu um PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake = ingestão semanal tolerável provisória) de 100 ng de ocratoxina A por kg de peso corpóreo (ng/kg p.c.). Após estudos, este comitê de especialistas concluiu que esta PTWI pode ser adotada provisoriamente pois diante dos dados atuais este nível parece não apresentar riscos de causar nefropatias em humanos (Codex Alimentarius, 1999). Este valor corresponde a um PDTI (Provisional Daily Tolerable Intake = ingestão provisória diária tolerável) de 14 ng/kg p.c. Note-se que o comitê não levou em consideração o papel da toxina como carcinógeno.

No Canadá, uma avaliação de risco com relação à ocratoxina A sugeriu que o valor da PDTI ficasse entre 1,2 e 5,7 ng/kg p.c.. O Conselho de Ministros dos Países Nórdicos, por sua vez, escolheu uma TDI (Tolerable Daily Intake = ingestão diária tolerável) de 5 ng/kg p.c. e o Comitê Científico da Comissão Europeia para Alimentos sugeriu que a TDI ficasse abaixo de 5 ng/kg p.c. levando em consideração a atividade cancerígena da toxina (Kuiper-Goodman, 1996).

Na União Européia, 8 países analisaram amostras de café recolhidas em lojas e mercados. Com base nos resultados e na estimativa de que o europeu consome em média 4 xícaras de café por dia (o que eqüivaleria a 24 g de café torrado ou 8 g de café instantâneo) calcularam que a ingestão de café seria responsável apenas por 2% do PTWI (Stegen et al., 1997). Na Suíça, considerando uma ingestão de 3 a 4 xícaras de café por dia e uma contaminação média do café de 1 μg/kg, calculou-se a ingestão média de ocratoxina A através do café seria de 0,4 ng/kg p.c. por dia, portanto correspondendo a 2,5 % do PTWI (Studer-Rohr et al., 1995). Uma análise relata que um dinamarquês médio ingere cerca de 821 mL de café por dia e que para cada xícara de 170 mL gasta-se 6 g de café torrado. O dinamarquês adulto médio de 70 kg consumiria 0,2 ng/kg p.c. por dia. Este valor corresponde a 12,5% do PTWI (Jorgensen, 1998). Na Inglaterra, o consumidor médio consome 4,5 g café por dia no preparo da bebida e o grande consumidor 19,3 g , correspondendo a 0,4 ng/kg e 1,9 ng/kg p.c. por semana, respectivamente (Patel et al,1997). Portanto, o consumidor inglês em média estaria exposto a ingerir 0,4% e o grande consumidor 1,9% do PTWI para ocratoxina A através do café.

Levantamento realizado na região de Campinas, Estado de São Paulo, mostrou que a parcela da população adulta que consume café, ingere em média 284 mL por dia. Isto corresponde a cerca de 3 a 4 cafezinhos, ou seja um total de 25 g de café torrado e moído e preparado ao gosto brasileiro (Camargo, 1996). Assumindo que esta média seja válida para o resto do país e considerando um adulto hipotético de 70 kg , podemos calcular a ingestão média semanal . Com base no dado que atualmente dispomos sobre o café verde vendido internamente no Brasil (Tabela 5) de que a contaminação média com ocratoxina A é 2,4 μg/kg teríamos uma ingestão semanal da toxina de 6 ng/kg p.c. através do consumo de café. Isto assumindo ainda o caso extremo de que não ocorram perdas durante o processamento, o que diga-se de passagem, não é provável. Este adulto estaria consumindo 6% do PTWI.

O JECFA diante do problema de ocratoxina A em café, questiona se a ingestão de ocratoxina A em café é significativa para os consumidores a ponto de merecer limites específicos. Lembra ainda as discrepâncias de resultados sobre perdas de ocratoxina A durante a torrefação (Codex Alimentarius, 1999), assunto este que ainda demanda estudos mais completos.

UMA AVALIAÇÃO DA SITUAÇÃO DO CAFÉ BRASILEIRO

Podemos resumir reconhecendo que o problema de contaminação do café brasileiro com ocratoxina A não pode ser ignorado. Os dados atuais indicam, no entanto, que não se mostra crítico para a população interna consumidora da bebida, caso o café seja a única ou a mais importante fonte de ocratoxina A na dieta nacional. A ingestão, calculada com base na contaminação média em café verde e assumindo que não haja perdas durante o processamento, corresponderia a 6% da ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) estabelecida pela FAO para ocratoxina A. O aspecto de saúde pública para nossa população não pode, no entanto, ser descurado por estarmos tratando com toxinas cancerígenas. Assim sendo, fazem-se necessários levantamentos mais extensos que forneçam um quadro mais completo da situação do café produzido no país, inclusive da variedade *C. canephora*, da qual poucas amostras foram examinadas até agora.

Do ponto de vista de exportação, o café nacional evidentemente não apresenta problemas maiores quando comparado com o produzido em outras partes do mundo. Os dados atuais indicam

inclusive uma situação ligeiramente favorável ao café brasileiro. No entanto, o café exportado está sujeito às regulamentações dos países importadores. Alguns países adotaram recentemente limites para ocratoxina A em café verde. Em 1996, a Itália estabeleceu, a título de recomendação, o valor de 4 μg/kg como limite para ocratoxina A em café verde (Ministerio delle Finanze, 1996). Já a Grécia adota 20 μg/kg como limite para café verde. A República Checa regulamenta em 20 μg/kg e a Romênia em 5 μg/kg , o limite para ocratoxina A em todos os alimentos (FAO, 1996). Seria arriscado ignorar esta tendência dos países importadores em estabelecer limites e as possíveis barreiras alfandegárias que daí adviriam.

O assunto como um todo merece estudos mais detalhados que preparem este segmento produtivo para o problema. Medidas preventivas são as mais recomendáveis em se tratando de contaminantes. Estudos que revelem em que etapa a contaminação ocorre e que fatores podem controla-la são necessários. O efeito da torrefação e de outras etapas do processamento precisam também ser melhor estudados.

BIBLIOGRAFIA

Blanc, M., Pittet, A., Munoz-Box, R. e Viani R. 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. J. Agric. Food Chem. 46: 673 – 675.

Boudra, H., Le Bars, P. e Le Bars, J. 1995. Thermoestability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61:1156 – 1158.

Bucheli, P., Meyer, I., Pittet, A., Vuataz, G. e Viani, R. 1998. Industrial storage of green robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. J. Agric. Food Chem. 46: 4507 – 4511.

Busby Jr., W.F. e Wogan, G.N. 1981. Ochratoxins. *In* Shank, R.C. (ed.) Mycotoxins and N-Nitroso Compounds: Environmental Risks. Vol II., CRC Press, Boca Raton, FL.

Camargo, M.C.R. 1996. Avaliação da ingestão potencial de cafeína pela população de Campinas. Tese de mestrado UNICAMP.

Cantàfora, A., Gossi, M., Miraglia, L. e Benelli, L. 1983. Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed- phase high performance liquid chromatography. Riv. Soc. Ital. Sci. Alim. 12:103 – 108.Codex Alimentarius. 1999. Position paper on ochratoxin A. Codex Comittee on Food Additives and Contaminants, Roma, Itália.

Creppy, E., Castegnaro, M. e Dirheimer, G. 1993. Human ochratoxicosis and its pathologies, John Libbey Eurotext, França.

FAO. 1996. Worldwide regulations for mycotoxins. FAO Food and Nutrition Paper, Food and Agriculture Organization, Roma, Itália.

Furlani, R.P.Z. 1998. Ocratoxina A em café brasileiro, tese de mestrado, UNICAMP.

Jorgensen, K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Add. Contam. 15: 550-554.

IARC. 1993. Some naturally occurring substances; food items and constituents; hetrocyclic aromatic amines and mycotoxins, International Agency for Reseach on Cancer, Geneva, Suíça. Kuiper-Goodman, T. 1996. Risk assessment o ochratoxin A: an update. Food Add. Contam. 13 (Supplement): 53-57. Leoni, L.A.B. 1999 (Comunicação pessoal).

Levi, C. 1980. Mycotoxins in coffee. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63: 1282 – 1285.

Levi, C., Trenk, H.L. e Mohr, H.K. 1974. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. J. A.O.A.C. 57: 866 – 871.

Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M. e Brera, C. 1989. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. Food Add. Contam. 3:333-339.

Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Desiderio C. e Masci, V. 1992. The effect of roasting on the fate of aflatoxin A in artificially contaminated green coffee beans. Mycotoxin Res. 8: 93 – 97.

Mislivec, P.B., Bruce, V.R. e Gibson, R. 1983. Incidence of toxigenic and ogher molds in green coffee beans. J. Food Protec. 46: 969 – 973.

Ministerio delle finanze, 1996. Dipartamento Dogane, Circolare no. 76, Roma, Itália.

Moss, M.O. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. Food Add. Contam. 13 (Supplement): 5-9.

Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. e Ueno, Y. 1997. Survey of aflatoxin B_1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. Food Agric. Immun. 9: 77 – 83.

Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G.M. e Gleadle, A.E. 1997. Food Add. Contam 3: 217 – 222.

Plestina, R. 1996. Nephrotoxicity of ochratoxin A. Food Add. Contam. 13 (Supplement): 49-50.

Pohland, A.E.; Nesheim, S. e Friedman, L. 1992. Ochratoxin A: a review. Pure Appl. Chem. 64: 1029 – 1046.

Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxim in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chem. 59: 57- 67.

Schlatter, C., Studer-Rohr, J. e Rasonyi, T. 1996. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. Food Add. Contam. 13 (Supplement): 43-44.

Stegen, G.v.d., Jorissen, U., Pittet, A., Saccon, M., Steiner, W., Vincenzi, M., Winkler, M., Zapp, J. e Schlatter, C. 1997. Screening of European coffee final products for ocurrence of ochratoxin A. Food Add. Contam. 14: 211 – 216.

Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R. Schlatter, J. e Schlater, C. 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. Fd. Chem. Toxic. 33:341- 355.

Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y. e Udagawa, S. 1987. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. Mycopathology 97: 111 – 115.

Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. e Sakabe, Y. 1988. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. J. Agric. Food Chem. 36: 540 – 542.

Trucksess, M.W., Giler, J. e Young, K., White, K.D. e Page, S. 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee – 1997. J. AOAC Int. 82: 85 – 89.

RESULTADOS E DESAFIOS DO PROGRAMA DE AUTOFISCALIZAÇÃO DO CAFÉ TORRADO E MOÍDO: SELO ABIC

Celso Luis Rodrigues Vegro[1], Célia Regina R. P.Tavares Ferreira[2]

[1] Engº Agrº MS. Pesquisador Cientifico de Economia Agrícola da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de SP.
[2]Engª Agrª MS. Pesquisadora Cientifica de Economia Agrícola da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de SP.

INTRODUÇÃO

O Programa de Autofiscalização do Café, patrocinado pela Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC), foi lançado em 1989, tendo por objetivo melhorar a imagem do T&M através da garantia de sua pureza aos consumidores brasileiros. O elemento chave desse esforço foi a inclusão nas diferentes marcas comerciais fiscalizadas de um selo padrão denominado: "Selo de Pureza ABIC" (ASSOCIAÇÃO,s.d.).

A autofiscalização surtiu resultados inflexionando a curva do consumo de T&M pois, enquanto em 1989 consumiram-se 6,4 milhões sacas de café verde, estima-se que em 1998 consumiu-se 12 milhões.

O programa já analisou, no Instituto Adolfo Lutz (IAL), 37 mil amostras de café. Na última coleta, divulgada em setembro de 1998, foram analisadas 2.819 amostras. Como resultado tem-se que 95% das marcas de café comercializadas no País são puras; e as 5% impuras representam apenas 1% do café consumido no mercado inteiro. Há dez anos, 30% das marcas eram impuras (PROGRAMA, 1998).

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é verificar os resultados do "Programa de Autofiscalização de Café da ABIC – Selo de Pureza ABIC", a partir de série histórica de coletas de amostras de café T&M para o período 1996 a 1998 em nível nacional e regional.

MATERIAL E MÉTODO

Chama-se de impurezas toda substância que não é café, resultante do mau beneficiamento do produto, como cascas, paus, areia, etc., enquanto misturas são os produtos adicionados ao café para fraudá-lo, como milho, cevada, caramelo, etc. São também consideradas substâncias estranhas naturais as bactérias, os fungos, os ácaros e fragmentos de insetos (IAL, 1997).

Os resultados das coletas nacionais liberados para divulgação pública formam o material fundamental de análise. Foram separadas para este estudo quatro coletas da ABIC para verificação da pureza: 1996 (duas), 1997 e 1998, publicada em CONTROLE (1996), CAI (1997), MAIOR (1997) e PROGRAMA (1998), respectivamente. O procedimento de coleta adotado baseia-se em rotina estabelecida em ABIC 1993, sendo realizada por meio de empresa de auditoria independente.

POSSIBILIDADES E PRÁTICA DE FRAUDES NO T&M

Entre os gêneros alimentícios, o T&M é um dos que não oferece grandes dificuldades para a fraude.As "vantagens" da adulteração do produto, são inúmeras, como por exemplo: a) melhor rentabilidade, uma vez que, as impurezas e misturas mais comuns apresentam preços menores quando comparados com os do café verde (mesmo de tipo inferior); b) reduz o número de xícaras, obrigando assim, o comprador adquirir maiores quantidades" (CAMARGO e TELLES, 1953), e c) a adição de açúcar ao grão torrado reduzir o consumo de energia e a quebra de peso.

O café apresenta, historicamente, ciclos de altas e baixas cotações no mercado. Nos ciclos de alta, tornou-se comum nos países importadores chancelar as fraudes visando baratear o produto, sendo mantido o critério nas baixas.

As torrefadoras que dispõe de equipamentos defasados ou modernos, porém mal ajustados, ao adquirirem matéria-prima de tipo inferior, não conseguem produzir T&M com margens inferiores a 1% de impurezas (cascas, paus, resíduos celulósicos e terra). Dessa forma, seu produto é considerado adulterado pela legislação 3. Essa dificuldade já foi reconhecida pela ABIC que elevou seu patamar para verificação da pureza ao nível de 2%. Noutras situações, a adição de impurezas ao café verde é estratégia para baratear

o produto lesando, dessa forma, os consumidores e a competitividade empresarial.
Também pode haver a adição de misturas nas fraudes do pó, sendo as mais usuais o milho, a cevada, o açúcar e a borra esgotada residual de café solúvel.

ANÁLISE E RESULTADOS

Nas duas coletas realizadas em 1996, as amostras com verificação de fraude provinham, majoritariamente, de torrefadoras não participantes com 114 e 72 com problemas frente 22 e 3 participantes em igual situação. Esses resultados não sofrem alterações significativas em outubro de 1997, já na coleta de setembro de 1998 observa-se elevação significativa no número de empresas participantes com fraudes, atingindo 12% do total de empresas (Tabela 1). Explicação para esse salto pode ser a falta de atenção das torrefadoras à qualidade da matéria-prima, adquirindo cafés de baixa qualidade que acabam influenciando no percentual de cascas, paus e gravetos.

TABELA 1 - Número de Amostras Total e de Torrefadoras Subscritas ou não ao Programa de Autofiscalização da ABIC com Adulteração, 1996, 1997 e 1998

Item	1996		1997	1998
	Jan.-jun.	Out.-dez.	Out.	Set.
Número de amostras	2.960	1.115	2.642	2.819
Torrefadoras participantes	22	3	6	18
Torrefadoras não participantes	114	72	125	140
Total	136	75	131	158

Fonte: Elaborado a partir de CONTROLE (1996), CAI (1997), MAIOR (1997) e PROGRAMA (1998).

Analisando-se a distribuição regional das torrefadoras com adulteração do produto final, percebe-se, predominância de torrefadoras localizadas no Sudeste, seguidas pelas do Nordeste. O esforço pela diminuição de adulterações foi desenvolvido igualmente nas regiões, ou seja, não existiu prioridades regionais na redução das fraudes no café (Tabela 2).

TABELA 2 - Torrefadoras Participantes e Não Participantes do Programa de Autofiscalização da ABIC com Impurezas e/ou Mistura no Café por Região, Brasil, 1996, 1997 e 1998

Reg.	1996				1997		1998	
	Jan-jun.		Out- dez.		Outubro		Setembro	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
N	8	5,9	9	11,8	11	8,4	7	4,4
Ne	40	29,4	16	21,1	22	16,8	39	24,7
CO	9	6,6	6	7,9	8	6,1	12	7,6
Se	62	45,6	33	44,7	69	52,7	75	47,5
S	17	12,5	11	14,5	21	16,0	25	15,8
Total	136	100	75	100	131	100	158	100

Fonte: Elaborado a partir de CONTROLE (1996), CAI (1997), MAIOR (1997) e PROGRAMA (1998).

O fraude com a impureza "casca e paus" foi o que predominou, no período em análise, correspondendo em média a cerca de 51,6% das torrefadoras, seguido do milho (25,0%), centeio (13,8%), cevada (2,8%) e outros (6,8%). É interessante observar que cresce a participação do fraude com centeio de 7,4% em janeiro a junho de 1996 para 25,9%em setembro de 1998, em detrimento do milho (decresce de 26,5% para 17,7%, no período) e da cevada (cai de 5,1% para 1,9%). Hipótese explicativa sobre o aumento da mistura com centeio pode ser as mudanças nos preços relativos desse produto frente as alternativas similares (cevada e milho), o que induziu o aparecimento de maior numero de empresas utilizando o centeio nas fraudes.
O número de torrefadoras pode, ainda, ser analisado segundo a distribuição por classe de impureza e/ou mistura. Em termos de impurezas (cascas e paus) as classes de 1,0% a 2,5% e 2,6% a 5% perfazem a ampla maioria de torrefadoras com fraudes no T&M. Para o caso das misturas, optou-se neste estudo pela elaboração de classes para o milho, cevada e centeio. A faixa de mistura com milho mais usual entre as torrefadoras que fraudam o produto foi de 30,1% - 45,0%. A mistura com cevada e centeio apresentaram maior concentração de firmas adulteradores com mais de 30,1% de mistura. (Tabela 3)

Tabela 3-Número de Torrefadoras por Tipo de Impureza e/ou Mistura Constatada no Café, Programa de Autofiscalização da ABIC, Brasil, 1996/98.

Coleta	Cascas e paus					Milho			
	1,0-2,5%	2,6-5,0%	5,1-7,5%	7,6-10,0%	10,1% +	Até 15%	15,1-30,0%	30,1-45,0%	45,1% +
Jan-jun./96	15	40	8	3	1	0	6	8	22
Out-dez./96	10	17	8	0	0	0	4	5	18
Out/97	32	27	16	0	2	1	4	6	23
Set/98	15	45	12	3	4	1	1	10	16
Total	72	129	44	6	7	2	15	29	79

Coleta	Cevada				Centeio		Outros	Total
	Até 10%	10,1-20,0%	20,1-30,0%	30,1% +	Até 30,0%	30,1% +		
Jan-jun./96	0	1	2	4	1	9	16	136
Out-dez./96	0	0	0	1	4	3	5	75
Out/97	0	1	2	0	6	5	6	131
Set/98	0	1	0	2	17	24	7	158
Total	0	3	4	7	28	41	34	500

[1] Caramelo, açúcar cristal, trigo e outros.
Fonte: Elaborado a partir de CONTROLE (1996), CAI (1997), MAIOR (1997) e PROGRAMA (1998).

O programa de autofiscalização da ABIC parece ter alcançado maior eficácia no controle das fraudes com impurezas, do que com misturas. Enquanto no caso das impurezas, as adulterações rondam o limite máximo permitido (2% no programa do selo), no caso das misturas as fraudes mantêm-se nos mesmos patamares ao longo das coletas.

COMENTÁRIOS FINAIS E SUGESTÕES

O programa do Selo ABIC, tem resgatado parcela substancial dos consumidores de café, antes indiferentes ao produto. Entretanto, o programa ainda possui agenda de desafios dentre os quais sugerem-se: a) melhor articulação com as instituições e mecanismos jurídicos legais ágeis para cobrir as fraudes, b) fiscalização do T&M distribuído através de cestas básicas que representa 2% do total distribuído e, também, o comercializado nas padarias e cozinhas industriais que soma 6% e 2%, respectivamente, c) a manutenção do patamar tolerado de impurezas de 2% colide com as metas propostas pelo "Selo de Pureza da ABIC" pois, deveria ser explicitamente acompanhada de processo que oriente os torrefadores à modificarem a cultura empresarial e gerencial, priorizando a qualidade do produto.

LITERATURA CITADA

ASSOCIAÇÃO Brasileira da Indústria de Torrefação e Moagem de Café (ABIC) - divulga resultado das análises da 10 coleta nacional de café torrado e moído. Rio de Janeiro. jan/1993. 9p.

Programa de Controle de Pureza do Café: ABIC divulga resultado de nova coleta nacional. Rio de Janeiro. (s/d). 13p.

CAMARGO, Rogério de & TELLES Jr., Adalberto de Queiroz. **O café no Brasil: sua aclimatação e industrialização**. In: Séries Estudos Brasileiros n.4, vol. II. Rio de Janeiro, 1953. 722p.

CAI o número de cafés impuros ou adulterados. **Jornal do Café.** São Paulo, v.6, n.69, p:12-15, maio 1997.

CONTROLE de pureza do café: ação enérgica em defesa do consumidor. **Jornal do Café.** São Paulo, v.5, n.59 , p: 12-17, jul.1996.

INSTITUTO Adolfo Lutz: metodologia incontestável. **Jornal do Café.** São Paulo, v.6,n.66, p: 10-12, fev.1997.

MAIOR ação das promotorias e Procons. **Jornal do Café.** São Paulo, v.7, n.75, p:9-11, nov.1997.

PROGRAMA da ABIC disciplina o mercado. **Jornal do Café.** São Paulo, v.8, n.85, p:13-20, set.1998.

QUALIDADE DE BEBIDA DO CULTIVAR DE CAFÉ IAPAR-59 E OUTRAS

Tumoru Sera [1], Marcos Aurelio Bacceti [2]

[1]Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Londrina, Paraná, Brasil; - [2] Corretora Bacceti, Centro de [2] Comércio de Café do Norte do Paraná – CCCNP, Londrina, Paraná.

INTRODUÇÃO

O 'IAPAR-59' é uma nova cultivar do tipo linhagem resistente a ferrugem derivada de seleção efetuada na descendência do cruzamento entre *Coffea arabica var.* Villa Sarchi 971/10 e o "Híbrido de Timor 832/2", realizado no CIFC-Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, em Portugal, onde recebeu a denominação de H361 (IAPAR, 1994). A geração F2 (H361-4) foi recebida pelo IAC – Instituto Agronômico de Campinas, que a denominou LC 1669. Em 1975 o IAPAR introduziu a geração F3 (LC 1669 Ep.127 c.506), que passou a ser denominada IAPAR 75163.

Nos estudos realizados pelo IAPAR, a progênie 75163-22 destacou-se pelas características agronômicas e resistências à ferrugem .Seu desempenho nas regiões de Londrina, Loanda e Carlópolis demonstrou condições para seu lançamento como cultivar, passando a receber a denominação de IAPAR-59.

Na geração F1 do H361 analisada no CIFC, todas as plantas pertenciam ao grupo fisiológico A (plantas que apresentam resistência às 30 raças de *H. vastratrix* conhecidas no mundo). Assim, a maioria (94%) da população do IAPAR 59 tem resistência às 30 raças conhecidas de *H. vastratrix*.

Apesar dos testes de qualidade realizados antes do seu lançamento como cultivar, existem questionamentos quanto a qualidade da sua bebida comparativamente a outras cultivares. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a qualidade da bebida e outras características relacionadas a qualidade do 'IAPAR-59' e outros cultivares experimentais junto com os cultivares padrões Catuaí, Mundo Novo e Bourbon Vermelho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de frutos colhidos em estádio cereja dos 10 cultivares foram descascados, degomados microbianamente e secados a sombra. Testaram-se os seguintes cultivares:

1. IAC2077-2-5-81(Catuaí Vermelho);
2. Icatu Precoce IAC 3282:
3. IAC376-4 (Mundo Novo);
4. IAPAR-59 (Sarchimor);
5. F2 IAPAR-59 X Mundo Novo;
6. F2 de IAPAR-59 X Icatuaí;
7. IAPARLF77028 (Sarchimor);
8. Catuaí Sh2Sh3 (cultivar experimental);
9. Maragogipe;
10. IAPAR LF77054-21 (Icatu x Catuaí, cultivar experimental).

A análise sensorial através da prova em xícara foram realizados no Centro de Comércio de Café do Norte do Paraná - CCCNP por 3 provadores para cada cultivar.

RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

Obtiveram-se os resultados apresentados no QUADRO 1 quanto a tamanho dos grãos e o tipo de bebida avaliada por 3 provadores. Em confronto com as características de bebida das cultivares recomendadas para o estado do Paraná (SERA, 1995) podemos tirar algumas conclusões.

A testemunha "Catuaí Vermelho" 'IAC 2077-2-5-81' apresentou as bebidas dura ácida, dura e dura levemente ácida e com peneira média dos grãos de 16,3.

A cultivar IAC 3282 de "Icatu Precoce" apresentou bebidas dura, dura e dura com peneira 16,3, portanto, com tamanho dos grãos e bebida semelhantes ao 'Catuaí'. A cultivar IAC 376-4 de "Mundo Novo" apresentou bebidas dura para melhor, dura limpa e dura com peneira 16,6, portanto melhor que "Catuaí".

Repetindo os testes anteriores (SERA, 1996), a cultivar IAPAR-59 mostrou-se melhores que "Catuaí" e "Mundo Novo", apresentando bebidas dura para melhor, dura limpa e dura para melhor com peneira 16,6. Assim, 'IAPAR-59' recebendo nível de tratos culturais semelhantes, superam as cultivares comerciais mais cultivadas quanto a bebida e igual a "Mundo Novo" em tamanho dos grãos.

Ao obter cultivar híbrida F2 IAPAR-59 x Mundo Novo, as bebidas dura, dura e dura superior com peneira 16,7, grãos ligeiramente maiores que o "Mundo Novo". A bebida foi ligeiramente inferior que o "Mundo Novo" mas assim mesmo entre os melhores mas com vantagem de grãos um pouco maiores do que qualquer um dos parentais o que indica que apresenta vigor de híbrido como de fato apresenta.

A bebida predominante foi de "Catuaí" na cultivar híbrida F2 IAPAR-59 x (Icatu x Catuaí) apresentando as bebidas dura ácida, dura e dura

levemente ácida com peneira 17,2, grãos maiores que "Mundo Novo", provavelmente pelo vigor de híbrido que deve ter dado melhores condições nutricionais para a granação dos seus frutos.

A cultivar experimental Iapar LF77055-21-22 de "Icatuaí" (Icatu x Catuaí) apresentou as bebidas dura, dura e dura, e peneira 16,4, semelhante a "Catuaí". Assim, observa-se que num híbrido em que participa o "Catuaí" ela predomina na característica bebida. O mesmo ocorreu com o cultivar experimental IaparLF-77039 de "Catuaí Sh2Sh3". Observe que o IaparLF-77055-21 já apresenta um tamanho de grão semelhante a "Catuaí" o que o torna promissor para futuros lançamentos desde que a qualidade da bebida é semelhante a "Catuaí".

A cultivar experimental IAPARLF 77028 também do germoplasma Sarchimor, como o é o Iapar-59, apresentou as bebidas dura para melhor ácida, dura ácida e dura encorpada, portanto, melhores que as bebidas do "Catuaí" e do "Mundo Novo" e com peneira 17,2 (graúdas), semelhante a 'Acaiá', a melhor tanto em bebida como em tamanho de grãos. Isto eqüivale ao 'Iapar-59' em bebida e supera no aspecto qualidade visual dos grãos sendo bem maiores, o que pode ser importante em alguns mercados mais exigentes.

QUADRO 1. Tamanho dos grão e prova de xícara quanto a bebida de 10 cultivares de café despolpados em Londrina-Paraná safra 1998/99.

Cultivares	Tamanho dos Grãos	Bebida 1	Bebida 2	Bebida 3
Catuaí Verm. IAC-81	Peneira 16,3	Dura	Dura	Dura
Icatu Precoce IAC 3282	Peneira 16,3	Dura	Dura	Dura
Mundo Novo IAC 376-4	Peneira 16,6	Dura +	Dura +	Dura
Iapar-59	Peneira 16,6	Dura +	Dura +	Dura +
F2 Iapar-59 x Mundo Novo	Peneira 16,7	Dura	Dura	Dura +
F2 Iapar-59 x Icatuaí	Peneira 15,9	Dura	Dura	Dura
Catuaí Sh2Sh3	Peneira 17,2	Dura	Dura	Dura
Iapar LF77055	Peneira 16,9	Dura	Dura	Dura
Maragogipe	Peneira 17,8	Dura (-)	Dura (-)	Dura (-)
Iapar Lf-77028	Peneira 17,2	Dura +	Dura	Dura +

Tamanho dos grãos = Peneira variando de 14 para 20, sendo as maiores mais graúdas;
Bebida = Rio, Riada, Dura (-), Dura, Dura +, sendo esta última, melhor.

CONCLUSÕES

A qualidade de bebida do "Bourbon", é tido como ligeiramente melhor que "Mundo Novo" entre os provadores experientes. Nesta prova de bebida, o 'Iapar-59' mostrou se ligeiramente melhor que "Mundo Novo". Assim sendo, o 'Iapar-59' se enquadra bem na categoria do "Bourbon Vermelho" e com vantagem de ser resistente à ferrugem e de porte pequeno, ideal para plantios adensados. Na mesma categoria se enquadra o cultivar experimental IaparLF-77028 de "Sarchimor" e com a vantagem de ter grão maior

DE CAFÉ, 2, Santo Antônio da Platina , 1995. **Anais...** Santo Antônio da Platina: APAC, p.41-67. 1995. o que melhora a qualidade visual.

REFERÊNCIAS

IAPAR. IAPAR-59, cultivar de café resistente a ferrugem. Londrina, 1994 (Folheto).

SERA, T.; ANDROCIOLI F°; A. CARDOSO, R. M. L.; DIAS, M. C.L.L. IAPAR-59 – Cultivar de café para o plantio adensado, In: INTEN. SYMP. ON HIGH DENSITY COFFEE PLANTING 1994. **Anais...** Londrina, Paraná. 1996. P.293-294.

SERA, T. Cultivares na nova cafeicultura para o Paraná. In: ENCONTRO PARANAENSE

EFEITO DA ADUBAÇÃO POTÁSSICA NA QUALIDADE DOS GRÃOS BENEFICIADOS DE CAFÉ[1]

Enilson De Barros Silva, Francisco Dias Nogueira, Paulo Tácito Gontijo Guimarães, Silvio Júlio De Rezende Chagas & Laerte Costa

INTRODUÇÃO

Para uma maior competitividade do café brasileiro através da melhoria do produto, torna-se necessário, apoiar-se numa pesquisa multidisciplinar, com características voltadas para a qualidade da bebida, que é o interesse final.

A influência do local de cultivo na qualidade da bebida tem sido intensivamente documentada, porém o mecanismo destes efeitos é pouco estudado. No Estado de Minas Gerais tem sido muito discutida a diferença existente entre qualidades de cafés produzidos na Zona da Mata, Sul de Minas e Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, sem nenhuma referência nestes locais do efeito da adubação potássica na qualidade do café.

O potássio tem sido, há muito tempo, considerado o "elemento da qualidade" em nutrição de plantas. Apesar desta reputação qualitativa e de aumentar a produção agrícola, normalmente ignora-se a extensão dos benefícios da adubação potássica. A qualidade dos produtos agrícolas não é facilmente definida ou medida como se faz para produção. O padrão de qualidade depende de propósitos, pelos quais, a planta ou parte dela é utilizada (Mengel e Kirkby, 1987). No caso do café, o mais importante é o reflexo da adubação na produção, além dos efeitos sobre os compostos químicos responsáveis pela qualidade da bebida (Silva, 1995).

A atividade da enzima polifenoloxidase está correlacionada positivamente com a qualidade da bebida do café arabica, no Brasil (Amorim e Silva, 1968) foi confirmada posteriormente por Rotemberg e Iachan (1972), também no Brasil e por Sanint e Valência (1972) na Colômbia. Dentro desta linha de pesquisa, Arcila-Pulgarin e Valência-Aristizábal (1975) estudaram o efeito da fertilização potássica sobre a atividade da polifenoloxidase e não encontraram diferenças estatísticas entre os seguintes tratamentos: testemunha, cloreto de potássio (KCl), sulfato de potássio (K_2SO_4), KCl + N + P + Mg e K_2SO_4 + N + P + Mg; a fertilização potássica aumentou os teores de K nos grãos, sem correlacionar com a atividade da enzima, mas observou-se uma maior atividade da enzima polifenoloxidase, quando se aplicou o sulfato de potássio.

Carvalho et al. (1994) registraram haver variações da atividade da polifenoloxidase, que permitem separar as classes de bebida com base nas atividades destas enzimas, mostrando para o café de bebida "riado e rio" atividades inferiores a 55,99 U mim^{-1} g^{-1} de amostra; nos cafés de bebida "dura" atividades entre 55,99 e 62,99 U mim^{-1} g^{-1} de amostra; nos cafés de bebida "mole" atividades entre 62,99 e 67,66 U mim^{-1} g^{-1} de amostra e nos cafés de bebida "estritamente mole" atividades superiores a 67,66 U mim^{-1} g^{-1} de amostra, constatando assim um aumento significativo na atividade da polifenoloxidase à medida que o café apresenta-se de melhor qualidade.

Santinato et al. (1996), no Brasil, utilizaram doses crescentes de 0, 114, 145 e 208 kg de $K.ha^{-1}$ para variedade Acaiá em Latossolo Vermelho Amarelo mas não encontraram melhoria da bebida, avaliada sensorialmente pela "prova da xícara" entre as doses de K na forma de salitre potássico.

Malavolta (1986) estudou o efeito das fontes de S (sulfato de amônio, $K_2SO_4MgSO_4$ e fosfogesso) e doses de S (0, 20 e 40 kg de $S.ha^{-1}$) na produção e qualidade da bebida pela "prova da xícara" mas não encontrou diferença na qualidade da bebida na média de quatro safras (1981/82 a 1984/85) no município de Olímpia (SP) em Podzólico Vermelho Amarelo. As doses utilizadas pelo autor correspondem, na forma de sulfato de potássio (15% de S), em 0, 133 e 266 kg de sulfato de $potássio.ha^{-1}$.

Em trabalho recente, Silva et al. (1999) estudaram o efeito de fontes e doses de K na composição físico-química e química dos grãos de café beneficiados da região do Sul de Minas (São Sebastião do Paraíso) observaram uma maior atividade da polifenoloxidase, índice de coloração e açúcares totais, e baixa acidez titulável total em cafés adubados com a fonte sulfato de potássio, confirmando que esta fonte proporcionava uma melhor qualidade do café. Os autores encontraram uma redução do teor de açúcar não redutor com aumento das doses de K na forma de KCl e o inverso com a fonte sulfato de potássio, e mesma tendência ocorreu para os açúcares totais.

Com relação aos íons influenciando a atividade enzimática da polifenoloxidase, Fox (1991) descreve os efeitos de solutos sobre a atividade

enzimática enfocando a inativação de enzimas pelo KCl e pelo NaCl atribuindo-se ao íon halogêneo (Cl^-) esta ação inibitória, tendo mencionado ainda alterações no sabor dos produtos o que é de suma importância na avaliação da qualidade do café. Quimicamente , uma explicação poderia considerar que, as enzimas são ativada por íons metálicos, mas um excesso de íon halogênio poderia ocasionar uma reação de precipitação. Conhece-se também um poderoso efeito de certos ânions na desnaturação de proteína pela sua habilidade em promover a ruptura da cadeia orgânica, os quais são, em ordem decrescente: $SCN^- > ClO_4^- > I^- > Cl^-$ > acetato > SO_4^{-2}. No caso da polifenoloxidase esperar-se-ia uma interação ou reação de precipitação entre Cu^{+2} e Cl^- (Robinson e Eskin, 1991).

Por outro lado, plantas que recebem elevadas quantidades de Cl aumentam o conteúdo de água (Gouny,1973), e isto seria um efeito da adubação potássica na forma de KCl. Um maior teor de umidade nos frutos favorece a proliferação de microorganismos, e, segundo Leite (1991), qualquer condição adversa aos grãos de café beneficiados, a atividade da polifenoloxidase atua sobre os compostos fenólicos, diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos, facilitando consequentemente, a oxidação dos mesmos.

O objetivo deste trabalho é verificar o efeito de fontes e doses de K nas características físicas, físico-químicas e químicas dos grãos de café beneficiados em dois locais de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram instalados dois experimentos, sendo um no município de São Sebastião do Paraíso em Latossolo Roxo (LR) (pH=6,0; P=7,0, K=70 e S-SO_4^{-2}=19,5 mg.dm^{-3}; Ca=3,8, Mg=0,9 e Al=0,1 cmol$_c$.dm^{-3}; V=65% e matéria orgânica=2,6 dag.kg^{-1}) e outro em Patrocínio em Latossolo Vermelho Amarelo (LV) (pH=5,9; P=3,0, K=63 e S-SO_4^{-2}=17,5 mg.dm^{-3}; Ca=3,4, Mg=1,3 e Al=0,1 cmol$_c$.dm^{-3}; V=69% e matéria orgânica=3,1 dag.kg^{-1}), cujas análises de solo na profundidade de 0 a 20 cm, encontram-se na Tabela 1. Em ambos os locais, os experimentos foram delineados em blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, utilizando-se três fontes de K: cloreto de potássio (KCl), sulfato de potássio (K_2SO_4) e nitrato de potássio (KNO_3) nas parcelas e quatro doses de K (0, 100, 200 e 400 kg de K.ha^{-1}) aplicadas nas subparcelas com quatro repetições. A parcela experimental foi constituída de três linhas de oito covas, formando um total de 24 covas por parcela, sendo a parcela útil as seis covas centrais. Usou-se nos experimentos a espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Vermelho no espaçamento 3,5 x 0,7 m, com uma planta por cova, em ambos os locais de cultivo.

A atividade enzimática da polifenoloxidase foi determinada em amostras de grãos de café beneficiados moídos em moinho tipo Croton Mod.TE-580, em peneira de 30 mesh, referente a cada tratamento aplicado em cada ano agrícola por cada local de cultivo. A metodologia para avaliar a atividade enzimática da polifenoloxidase foi adaptado para maior rendimento nas análises de laboratório, conforme foi descrita por Draetta e Lima (1976). Foram pesados 5 g da amostra de café previamente moída e adicionaram-se 40 mL da solução de fosfato de potássio 0,1 mol.L^{-1} à pH 6,0. Em seguida, foi agitado por 5 minutos. Todo material utilizado foi mantido gelado. Após a agitação, fez-se a filtragem, utilizando-se papel de filtro Whatman nº 1. A atividade da polifenoloxidase foi determinada pelo método descrito por Ponting e Joslyng (1948). Utilizou-se o extrato da amostra sem DOPA (3,4 dihidroxifenil-alanina) como branco expressa em U.mim^{-1}.g^{-1} (Unidade de atividade enzimática por unidade de tempo em minutos por gramas de grãos beneficiados).

Os dados das variáveis qualitativas foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial. Utilizou-se o programa SAS para análise estatística, estabelecendo-se os níveis de significância de 5% e 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da atividade enzimática da polifenoloxidase em dois locais de cultivo sobre o efeito de fontes e doses de K encontram-se na Tabela 1. Houve interação significativa entre fontes e doses de K na atividade enzimática da polifenoloxidase.

Em relação aos dados médios obtidos (Tabela 1), verifica-se que as atividades enzimáticas da polifenoloxidase, em Patrocínio (Cerrado), foram elevadas em relação aos obtidos em São Sebastião do Paraíso (Sul de Minas), quando se comparam os valores de atividade enzimática nos tratamentos que não receberam de adubação potássica (testemunha= 0 kg de K.ha^{-1}). Verifica-se que nas testemunhas representativas de cada fonte de K, em São Sebastião do Paraíso que os grãos de café beneficiados foram classificados,

segundo Carvalho et al. (1994), como não aceitável ("riada" e "rio") ao contrário do ocorrido em Patrocínio, onde na ausência de fertilizantes potássicos a qualidade da bebida foi equivalente àquela aceitável ("dura"). Resultado semelhante foi encontrado por Chagas (1994) que obteve uma maior atividade enzimática da polifenoloxidase nos municípios da Região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, incluso cafés do município de Patrocínio.

TABELA 1. Valores médios da atividade enzimática da polifenoloxidase em função de fontes e doses de K em dois locais de cultivo.

Doses de K	**Atividade enzimática da polifenoloxidase (U.mim^{-1}.g^{-1} de amostra)**		
kg.ha^{-1}	KCl	K_2SO_4	KNO_3
.....São Sebastião do Paraíso.....			
0	55.02 a C	55.20 a C	54.12 a C
100	59.63 b A	61.91 b B	66.56 a A
200	61,73 b A	66.77 a A	65.57 a A
400	57.46 b B	60.93 a B	61.40 a B
Média	**58,45 b**	**61,20 a**	**61,91 a**
.....Patrocínio.....			
0	57.06 b C	61.06 a C	59.77 a C
100	63.15 b A	65,38 a B	67.80 a A
200	63.97 c A	68.37 a A	66,25 b A
400	60.31 b B	64.76 a B	63.26 a B
Média	**61,12**	**64,89**	**64,12**

Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Média de 4 anos agrícolas

Verifica-se pela Tabela 1, que a dose de 200 kg de K.ha^{-1} foi a que proporcionou a maior atividade enzimática da polifenoloxidase nas fontes KCl e K_2SO_4 e, para a fonte KNO_3, a dose de maior atividade foi com a aplicação de 100 kg de K.ha^{-1}.

A fonte KCl possui como íon acompanhante o cloreto, e, segundo Gouny (1973), plantas que recebem elevadas quantidades de cloreto aumentam o seu conteúdo de água e um maior teor de umidade nos frutos favorecem a proliferação de microorganismos (Chalfoun, 1996). Segundo Leite (1991), qualquer condição adversa aos grãos de café beneficiados, proporciona a ativação das polifenoloxidases que oxidariam os compostos fenólicos, diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos, sendo posteriormente inibidas competitivamente pelas quinonas formadas.

O resultado da fonte KCl que teve uma classificação inferior as outras duas fontes, em São Sebastião do Paraíso, o que se deve à atuação do íon cloreto em reduzir diretamente a atividade enzimática da polifenoloxidase, conforme se verifica-se na Tabela 2.

Tabela 2. Doses de K e atividades máximas eclassificação da bebida do café através atividade da polifenoloxidase em dois locais de cultivo.

Fonte de K	**Dose de K**	**Atividade da polifenoloxidase**	**Classificação da bebida**
	kg.ha^{-1}	U.min^{-1}.g^{-1} de amostra	(Equivalência da prova sensorial)
KCl	200	61,73	dura
K_2SO_4	200	66.85	mole e apenas mole
KNO_3	100	66,56	mole e apenas mole
KCl	200	63,97	mole e apenas mole
K_2SO_4	200	68,37	estritamente mole
KNO_3	100	67.80	estritamente mole

A enzima polifenoloxidase é ativada pelo íon cobre (Robison e Eskin, 1991), o qual é um ativador da enzima, mas o cloreto, segundo Fox (1991) inibe sua atividade devido à interação ou reação com o cobre, ocasionando, uma redução na atividade enzimática na fonte KCl (Tabela 2), em que certos ânions têm um poderoso efeito de desnaturação da proteína, isto é, ruptura da cadeia orgânica, os quais são , em ordem descrescente: $SCN^- > ClO_4^- > I^- > Cl^-$ > acetato > SO_4^{-2}.

Toda esta discussão a respeito da atuação do ânion cloreto sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase proporcionada pela fonte KCl, em Patrocínio, não se verifica para este local, sendo a diferença de umidade entre São Sebastião do Paraíso e Patrocínio, o qual o último possui uma menor propensão a umidade e desenvolvimento de microorganismo proporcionada pelo KCl, levando a uma qualidade próxima da bebida do café.

De modo geral, verifica-se que as fontes isentas de cloro promoveram maior atividade enzimática da polifenoloxidase, com maior resposta para a fonte KNO_3, na qual necessitou de menor dose de K que a fonte K_2SO_4. A atividade enzimática da polifenoloxidase é o parâmetro que melhor expressa a qualidade da bebida do café, conforme Amorim e Silva (1968), Carvalho et al. (1994), Chagas (1994), Silva (1995) e Chalfoun (1996).

Silva et al. (1999) e Arcila-Pulgarim e Valência-Aristizábal (1975) também encontraram maior atividade enzimática da polifenoloxidase com a fonte K_2SO_4, mas Arcila-Pulgarim e Valência-

Aristizábal (1975) não encontraram resposta a adubação potássica, embora observaram uma tendência de maior atividade da enzima polifenoloxidase, quando se aplicou sulfato de potássio. Malavolta (1986) estudou o efeito de fontes e doses de S na qualidade da bebida do café mas não encontrou diferença na qualidade avaliada pela "prova da xícara". A avaliação da qualidade, praticada comercialmente através de provadores, conhecida como "prova da xícara" é muito subjetiva (Chagas, 1994) em relação a atividade da polifenoloxidase ("Bebida Química"), dificultando detectar diferenças entre as amostras de grãos de café beneficiados quanto à adubação. O mesmo ocorreu com Santinato et al. (1996) não encontraram melhoria da qualidade ("prova da xícara") com a aplicação de doses crescentes de K na forma de salitre de potássio (KNO_3).

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclui-se que:
Fontes isentas de cloreto proporcionaram a melhor qualidade da bebida do café, com melhor resposta em São Sebastião do Paraíso;
As doses de 200 kg de $K.ha^{-1}$ na forma de KCl e K_2SO_4 e 100 kg de $K.ha^{-1}$ na forma de KNO_3 foram os que proporcionaram os melhores resultados qualitativos.

REFERÊNCIAS

Amorim, H.V. e Silva, D.M. 1968. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and quality of the beverage. Nature. 219(27):381-382.

Argila-Pulgarin, J. e Valência-Aristizábal, G. 1975. Relacion entre la actividade de la polifenol oxidasa (P.F.O.) y las pruebas de catacion como medidas de la calidad de la bebida del cafe. Cenicafé. 26(2):55-71.

Carvalho, V.D., Chagas, S.J.R., Chalfoun, S.M., Botrel, N. e Juste Junior, E.S.G. 1994. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiadoe a qualidade de bebida do café. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 29(3):449-454.

Chagas, S.J.R. 1994. Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais. ESAL. 95. Dissertação de Mestrado

Chalfoun, S.M.S. 1996. O café (*Coffea arabica* L.) na Região Sul de Minas Gerais-relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos. UFLA. 171. Tese de Doutorado.

Draetta, I.S. e Lima, D.C. 1976. Isolamentos e caracterização das polifenoloxidases do café. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos. 7:3-28.

Fox, P.F. 1991. Food enzymology. London, Elsevier Applied Science, 378.

Gouny, P. 1973. Observacones sobre el comportamento del vegetal en presencia de ions de cloro. Revista de la Potassa. 45(5):1-14.

Leite, I.P. 1991. Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café (*Coffea arabica*, L.). ESAL. 131. Dissertação de Mestrado.

Malavolta, E. 1986. Efeitos de doses e fontes de enxofre em culturas de interesse econômico. IV - Café. São Paulo. 41. Boletim Técnico 4.

Ponting, J.D. e Joslyng, M.A. 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Achives of Biochemistry. 19:47-63.

Robinson, D.S. e Eskin, N.A.M. 1991. Oxidative enzymes in foods. New York, Elsevier Applied Science, 314p.

Rotenberg, B. e Iachan, A. 1972. Contribuição ao estudo enzimático do grão de café. I. Tirosinase e lacase. Revista Brasileira de Tecnologia. 3:155-159.

Sanint, O.B. e Valéncia, A. 1972. Actividade enzimática en el grano de café en relación con la calidade de la bebida. I. Duración de la fermentación. Cenicafé. 23:59-71.

Santinato, R., Oliveira, L.H. e Pereira, E.M. 1996. Efeitos do uso de salitre de potássio como fonte de nitrogênio e potássio na adubação química do cafeeiro - Carmo do Paranaíba/MG - 1992/1996. In. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Águas de Lindóia. Anais. 22:180-184.

Silva, E.B. 1995. Potássio para cafeeiro: efeito de fontes, doses e determinação de cloreto. UFLA. 87p. Dissertação de Mestrado.

Silva, E.B., Nogueira, F.D., Guimarães, P.T.G., Chagas, S.J.R. e COSTA, L. 1999. Fontes e doses de potássio na produção e qualidade do grão de café beneficiado. Pesquisa Agropecuária Brasileira (No prelo)

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO EXSUDATO DE GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE DA BEBIDA

Prete[1], C.E.C. e Abrahão[2], J.T.M.

[1]Profº. Assossiado do Departamento de Agronomia da Universidade Est. de Londrina, Londrina - PR, Brasil.
[2]Profº. Titular Aposentado da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba - SP, Brasil.

SUMMARY

With the objective of enlarging the possibilites to determinate the coffee quality, the relation between electric conductivity of the exudate from crude coffee grains and the type quality of the beverage was studied. The methodology to evaluate the electric conductivity was developed at the Seed Laboratory of the Agriculture Department of ESALQ in Piracicaba-SP, during the period of 1990-1992. This initial exploratory test showed the best methodology to be the use of samples with 50 coffee grains, with known weight, immersed in 75 ml of destilled water, at 25°C during 3,5 hours, followed by shaking. After that the electric conductivity was measured using a conductivimeter and expressed in $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$ *for sample.The results indicate that: the most lixiviated ion from the coffee grains is potassium, wich is direct correlated (r = 99%) with the electric conductivity; the electric conductivity evolution follows the speed of the potassium lixiviation and of the water absorption by the grains; the electric conductivity is remarkable affected by imperfection in the coffee grains (stinkers, black bean, sours, unripes and boreds), because this imperfection sequence correspond to the order of importance in the degradation of the membrane system; also it was verified the influence of the humidity content, of the genotype and of the grain size; the increment of green fruits harvested depreciate the coffee quality, moreover when they are submitted to a drying temperature higher than 45°C. In this experimental conditions the eletric conductivity and the potassium lixiviation tests were more sensible to detect differences between treatments than usual procedures. The hulling of the fruits propitiate the obtainment of better coffee quality (better beverage, less imperfections and smaller electric conductivity) in ten harvest locations (Maringa, Londrina, Piracicaba, Campinas, Garca, Pindorama, Mococa, Patrocinio, Alfenas e Machado). It was concluded that occurs an inversed relation between coffee quality and electric conductivity, or the better the beverage quality the smaller is the electric conductivity of the exudates from the crude grain of coffee.*

INTRODUÇÃO

A competência dos produtores de café depende do empenho em controlar custos, aumentar a produção por hectare e elevar a qualidade da bebida.

Os atuais procedimentos de avaliação comercial da qualidade do café estão baseados em parâmetros empíricos e subjetivos pois dependem de sensações (visão, olfato e paladar) e habilidades pessoais, adquiridas com muitos anos de experiência. Assim a complementação dos procedimentos em uso com a adoção de métodos físicos e químicos tornaria mais real e objetiva a determinação da qualidade do café.

Os trabalhos de Amorim (1978), relacionando aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde com a deterioração da qualidade, muito contribuíram para realçar a hipótese de que a perda da permeabilidade e estrutura das membranas celulares conduz à deterioração do café.

Inúmeros trabalhos citados em Clifford (1985), indicam que os piores cafés, em termos de qualidade de bebida, possuem: menos proteínas solúveis, mais aminoácidos livres, mais ácido clorogênico, menos fenóis hidrolisáveis, menos ácido ascórbico, baixo teor em carboidratos e maior teor de ácido graxos livres com diminuição do conteúdo de lipídeos. Estes resultados indicam que ocorrem importantes reações oxidativas durante o processo de deterioração dos grãos de café sugerindo intensa peroxidação de lipídeos.

Dentre os compostos orgânicos estudados, especial atenção foi dada a enzima polifenoloxidase (PPO) a qual estava correlacionada positivamente com a qualidade da bebida do café como demonstraram Amorim e Silva (1968). In vivo, a enzima polifenoloxidase encontra-se ligada às membranas e é ativada somente quando liberada destas. Amorim (1978) sugere que danos ocorridos nas membranas liberam, e portanto ativam, a polifenoloxidase (PPO), que por sua vez oxida os ácidos clorogênicos à quinonas. A PPO é inibida pelas quinonas formadas, diminuindo sua atividade. Segundo Amorim (1978) qualquer fator ambiente que altere a estrutura da membrana, por exemplo ataque de insetos, infecções por microrganismos, alterações fisiológicas e danos mecânicos, provocam uma rápida deterioração dos grãos de café. Uma vez rompida a membrana celular ocorre

um maior contacto entre as enzimas e os compostos químicos presentes intra e extracelular no grão. Isto ocasiona reações químicas que modificam a composição química original do café verde e em conseqüência as propriedades organolépticas da infusão preparada com este.

Esta seqüência sugere, na verdade, que a qualidade inferior dos cafés com baixa atividade da PPO está relacionada com os danos às membranas celulares, sendo então a diminuição da PPO uma conseqüência disto.

Apesar da qualidade e aroma da bebida do café serem determinantes no estabelecimento de seu preço, as causas de variação da qualidade do produto somente agora estão sendo esclarecidas. A descoberta do composto 2,4-6 tricloroanisole (TCA) presentes em amostras de café Rio que sofreram ação de fungos *Aspergillus spp* esta relacionada com a má qualidade da bebida. Sem dúvida a ordem das reações químicas que ocorrem durante a formação do grão de café culmina na composição química final destes, e esta pode ser um importante fator na determinação da qualidade da bebida (Amorim e Melo, 1991).

Há, certamente, mecanismos tão complexos e interdependentes no processo de deterioração que nenhuma teoria simples poderia fornecer explicações definitivas e permitir afirmações taxativas sobre o que é, na realidade, conseqüência de uma somatória de eventos. Por outro lado, existe uma concordância de que a degeneração das membranas celulares e subsequente perda de controle da permeabilidade, seja um dos primeiros eventos que caracterizam a deterioração.

Testes baseados na perda de integridade das membranas foram desenvolvidos, estudados e utilizados por Mathews e Bradnock (1968), Absul-Baki e Anderson (1972), McDonald Jr e Wilson (1979), Yaklich et al. (1979), Steere et al. (1981), Powell (1986).

Nestes trabalhos as sementes são imersas em água e durante o processo de embebição, de acordo com o grau de integridade de suas membranas, lixiviam solutos citoplásmáticos no meio líquido. Os solutos, com propriedades eletrolíticas, possuem cargas elétricas que podem ser medidas com um condutivímetro. Assim sementes com baixo vigor liberam grande quantidade de eletrólitos na solução, resultando em alto valor de condutividade elétrica, ou em elevadas concentrações de determinados íons, principalmente potássio.

Amorim (1978) estudando aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde e relacionando os resultados com a deterioração da qualidade, verificou haver maior lixiviação de potássio nos grãos dos piores cafés. Este trabalho visa a confirmação da hipótese de que existe uma relação entre o teste de condutividade elétrica do exsudato de grãos de café com a sua qualidade, avaliada pelo tipo e bebida.

Pretende-se com isso obter um teste rápido, de baixo custo, fácil e seguro que possa complementar a avaliação da qualidade de grãos de café, favorecendo assim a obtenção de cafés de melhor qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Metodologia para Análise:
Condutividade elétrica

Utilizou-se metodologia proposta por Loeffler et al. (1988) que consistiu em utilizar quatro amostras de 50 grãos de cada parcela, sem escolha dos grãos defeituosos (pretos, brocados, verdes e ardidos), pesadas (precisão de 0,1g) e imersas em 75 ml de água destilada (no interior de copos de plástico de 180 ml de capacidade) e colocadas em câmara à 25°C.

Após o período de embebição de 3,5 horas, procedeu-se à leitura da condutividade elétrica da solução, em aparelho Digimed CD-20. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$

Lixiviação de potássio

Após a leitura da condutividade elétrica, a solução sem os grãos foi vertida para recipientes de vidro, dos quais eram removidas alíquotas para determinação da quantidade de potássio lixiviado. A análise do potássio foi realizada em fotômetro de chama Digimed NK-2002, sem prévia digestão e com os dados obtidos foi calculado o lixiviado de potássio expresso em ppm/g de amostra.

Teor de água dos grãos de café

Avaliado pelo método da estufa a 105 ± 3°C, durante 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1976).

Determinação da qualidade da bebida

Nos laboratórios de classificação de qualidade do café da UNICAFÉ - Londrina - PR, da Federação Meridional de Cooperativas Agropecuárias (FEMECAP) - Campinas - SP, e da Bolsa de Mercadorias e Futuros (BMF) - São Paulo - SP, foi realizada a determinação da qualidade da bebida pela prova de xícara.

Prova de Xícara

De cada amostra foram tomados 100 gramas de café beneficiado, que foram torrados, até os grãos atingirem cor achocolatada (ponto de estalo, torração americana). Após a torração o café foi

moído em moinhos especiais com granulação média apropriada (tamis de 14 fios por cm). A seguir foi preparada a infusão colocando-se 10 g de pó para 100 ml de água em ponto de fervura.
Para cada parcela foram preparadas cinco xícaras, que foram provadas por degustadores de elevada competência nos diferentes laboratórios de classificação.
Os resultados da degustação de cada xícara foram reduzidos a valores numéricos, segundo Tabela 1, proposta por Garruti e Conagin (1961), também utilizada por Miya et al. (1973/74).

Tabela 1. Características organolépticas e grau de pontuação dos tipos de bebida padrão em café.

Classificação da Bebida	Característica Organoléptica	Pontos
sritamente Mole	Bebida de sabor suavisíssimo e adocicado	24
Mole	Bebida de sabor suave, acentuado e adocicado	18
Apenas Mole	Bebida de sabor suave, porém com leve adstringência	13
Dura	Bebida com sabor adstringente, gosto áspero	11
Riada	Bebida com leve sabor de iodofórmio ou ácido fênico	7
Rio	Bebida com sabor forte e desagradável lembrando iodofórmio ou ácido fênico	1

Classificação por Tipos
No laboratório de classificação de qualidade do café da Bolsa de Mercadorias e Futuros - São Paulo - SP, foi realizada a classificação por tipos, onde cada amostra foi apreciada sobre cartolina preta, segundo as normas estabelecidas na "Tabela Oficial Brasileira de Classificação" (Teixeira et al., 1974).

Metodologia para obtenção dos tratamentos:
Efeito dos grãos defeituosos sobre a condutividade elétrica do exsudado
Foram obtidas amostras de café cultivar Mundo Novo, safra 1991/92, do Departamento de Agricultura da ESALQ - Piracicaba e separados os grãos com defeitos grão verde, grão brocado, grão ardido, grão preto e grão preto-verde ou "stinker".
Foram separadas 4 repetições de 10 grãos de cada tipo de defeito para nelas determinar o peso dos grãos, em balança de precisão de 0,001 g; a condutividade elétrica, após imersão dos grãos em 100 ml de água destilada (no interior de copos plásticos) a 25°C por 3,5 horas; a lixiviação de potássio na solução após 3,5 horas de embebição e o teor de umidade dos grãos.
Para a instalação deste experimento foi obedecido o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições.

Efeito da temperatura de secagem de frutos de café colhidos nos estádios de maturação cereja e verde sobre a condutividade elétrica dos grãos.
Em lavoura de café Mundo Novo linhagem LCP 388-17 pertencente ao Departamento de Agricultura da ESALQ, em Piracicaba foi colhida uma mistura de frutos verdes e cerejas de café aos vinte e sete dias do mês de maio de 1991.
Desta mistura foram separados manualmente os frutos cerejas dos verdes e em seguida de cada estádio de maturação foram compostas dezesseis parcelas de 600 gramas cada uma distribuídas no interior de bandejas. Cada quatro parcelas de frutos cerejas e verdes foram postas a secar simultaneamente à diferentes temperaturas constituindo os seguintes tratamentos:
1. Secagem natural à temperatura do ambiente de laboratório, mantida à 20°C.
2. Secagem artificial em estuda de circulação forçada de ar à 30°C.
3. Secagem artificial em estuda de circulação forçada de ar à 45°C.
4. Secagem artificial em estuda de circulação forçada de ar à 60°C.
O grau de umidade inicial dos frutos cerejas e verdes antes de iniciar a secagem eram respectivamente de 69,7% e 71,5%. A temperatura da massa de frutos durante toda a duração do experimento foi monitorada com a colocação de termômetros dentro das parcelas, a qual correspondeu perfeitamente as diferentes temperaturas selecionadas. Tomando por base o teor de água inicial e o peso de cada parcela, calculou-se o peso final de cada parcela quando os frutos atingiam 12% de umidade final.
A partir disto, periodicamente as parcelas foram pesadas e finalmente retiradas da estufa ao atingirem 12% de umidade. A seguir as parcelas ficaram armazenadas em ambiente de laboratório por três semanas, para uniformização do grau de umidade. Vencido este período de tempo cada parcela foi descascada em máquina para retirada de amostras marca Pinhalense.
De cada parcela foram separados e pesados os grãos normais, verdes, verde-escuros, pretos e preto-verdes brilhantes. A seguir foi calculada a porcentagem de grãos classificados em cada coloração. A seguir retirou-se de cada parcela quatro amostras de 50 sementes as quais, após pesadas e imersas em 75 ml de água destilada no interior de copos de plástico a 25°C durante 3,5 horas foram submetidas a análise da

condutividade elétrica em condutivímetro Digimed-CD-20. No exsudato de cada parcela foi determinada a quantidade de potássio em fotômetro de chama e os resultados expressos em ppm/grama.

De cada parcela foram determinados o tipo e a qualidade da bebida no laboratório de classificação de café da Bolsa de Mercadorias e Futuros em São Paulo - SP.

A instalação deste experimento obedeceu a delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (Estádios de Maturação) x 4 (Temperaturas de Secagem) com quatro repetições.

Efeito de locais e métodos de colheita sobre a condutividade elétrica de exsudatos de grãos de café

Em dez locais, realizou-se a colheita de frutos de café no estádio de maturação cereja, seguido de despolpamento; frutos de café em diferentes estádios de maturação derriçados no pano, constituindo assim uma mistura; e frutos de café no estádio de maturação seco recolhidos do chão, denominado café de varrição. Cada porção era constituída de aproximadamente 12 kilogramas de café em coco.

Os locais, com a latitude, longitude e altitude respectivas, de coleta dos lotes de café despolpado, mistura e varrição durante o períodode junho a setembro de 1991, foram:

Piracicaba - SP	22° 45'S	47° 40'W	540 m
Patrocínio - MG	18° 57'S	47° 00'W	933 m
Campinas - SP	22° 53'S	47° 06'W	562 m
Alfenas - MG	21° 28'S	45° 58'W	889 m
Machado - MG	21° 40'S	45° 55'W	873 m
Mococa - MG	21° 28'S	47° 01'W	665 m
Pindorama - SP	21° 13'S	48° 56'W	562 m
Garça - SP	22° 14'S	49° 36'W	663 m
Londrina - PR	23° 23'S	51° 11'W	566 m
Maringá - PR	23° 26'S	52° 02'W	355m

Após a colheita os frutos de café foram secos até 12% de umidade e permaneceram armazenados até novembro de 1991, no interior de sacos de juta, em ambiente apropriado na sala de sementes do D.A.H. / ESALQ, Piracicaba.

Em novembro de 1991, os diferentes lotes foram subdivididos em cinco amostras de dois litros cada uma. Estas foram beneficiadas em máquina, marca Pinhalense, para retirada de amostra. Em seguida cada amostra foi subdividida em três sub-amostras de 100 gramas, as quais foram embaladas em sacos plásticos devidamente identificados com numeração de 1 a 150, constituindo assim três grupos de 150 amostras.

Cada grupo de 150 amostras foi enviado aos locais para determinação da qualidade da bebida.

Na porção restante de cada amostra foram separadas quatro repetições de 50 grãos sem escolha, as quais foram pesadas e imersas em 75 ml de água destilada, no interior de copos de plástico de 180 ml de capacidade, e colocados em câmara a 25°C por 3,5 horas. Após este período de embebição, procedeu-se a leitura da condutividade elétrica da solução em condutivímetro Digimed-CD-20. Os valores obtidos em cada local de colheita foram submetidos a análise estatística. Foram analisadas as correlações entre as variáveis estudadas e os intervalos de confiança entre qualidade da bebida e condutividade elétrica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos grãos defeituosos sobre a condutividade elétrica do exsudato

Submeteu-se a análise de variância os dados de peso médio do grão, condutividade elétrica, lixiviação de potássio e teor de água após embebição, obtendo-se para todos os parâmetros avaliados valores significativos para efeito dos tratamentos.

Os grãos com dimensões semelhantes (tamanho) apresentaram pesos médios diferentes, sendo que os grãos normais ou sem defeitos apresentaram o maior peso médio. Os grãos defeituosos apresentaram a seguinte ordem decrescente de peso: grãos verdes, ardidos, brocados, pretos e preto-verdes.

Os valores de condutividade elétrica, lixiviação de potássio e teor de água após embebição foram significativamente menores nos grãos de café normais em relação aos grãos defeituosos, e dentre os grãos com defeitos, os preto-verdes apresentaram os maiores valores.

Considerando os dados da tabela 2, observa-se a seguinte ordem crescente de lixiviação de íons e condutividade elétrica: grãos normais, brocados semelhantes aos verdes, ardidos, pretos e preto-verdes.

Após a embebição, o teor de água ou grau de umidade dos grãos foram determinados e obedeceu a seguinte ordem crescente: grãos normais, brocados, verdes, ardidos semelhantes aos pretos e preto verdes.

Illy et al. (1982) realizou um estudo sobre as características de reflectância dos grãos defeituosos visando sua eliminação dos lotes de café através de seleção eletrônica pela cor. Neste estudo os autores além da reflectância estudaram também, através de microscopia eletrônica, as características da superfície e das células dos grãos defeituosos. Verificaram que a desorganização celular aumenta dos grãos verdes

Tabela 2. Valores de peso médio do grão, condutividade elétrica, lixiviação de potássio e teor de água de grãos normais e defeituosos de café Mundo Novo provenientes de Piracicaba - SP.

Tratamento	Peso Médio do grão (g)	Condutividade Elétrica ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$)	Potássio Lixiviado (ppm/g)	Umidade Após Embebição (%)
Normais	0,1320 A	40,28 A	15,56 A	38,49 A
Brocados	0,1086 CD	93,94 B	38,73 B	46,97 B
Verdes	0,1210 B	108,94 B	35,63 B	57,78 C
Ardidos	0,1134 BC	201,47 C	68,72 C	65,77 D
Pretos	0,1000 D	258,14 D	87,48 D	69,43 D
Preto	-	-	-	-
Verdes	0,0800 E	358,77 E	119,42 E	74,53 E
Valores de "F"	51,49**	123,54**	141,97**	148,09**
Coef.deVar. %	5,12	13,49	12,42	2,99
DMS 5%	0,01	46,66	14,47	2,93

Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo Teste de Tukey.
** indica $P < 0,01$

para os ardidos e destes para os grãos pretos. Essa desorganização celular permite que a água penetre e se difunda com maior facilidade quanto maior a gravidade dos danos celulares.

Essa hipótese tem confirmação nos resultados obtidos na tabela 2, onde os grãos normais passaram de 12% para 38,49% de umidade após 3,5 horas de embebição enquanto que os grãos verdes, ardidos, pretos e preto-verdes, passaram de 12% para 57,78%; 65,77%; 69,43% e 74,53% de umidade, respectivamente.

A desintegração das membranas celulares avaliadas pelos testes de condutividade elétrica e lixiviação de potássio seguiram a mesma ordem de gravidade dos defeitos do café.

Efeito da temperatura de secagem de frutos de café colhidos nos estádios de maturação cereja e verde sobre a condutividade elétrica dos grãos

Na tabela 3, observa-se que a secagem dos frutos colhidos no estádio cereja, independente da temperatura de secagem resultou em grãos normais, com pequeno número de defeitos. Os frutos cerejas secados naturalmente e a sombra apresentaram a melhor qualidade de bebida, enquanto que a secagem artificial à temperatura de 60°C alterou a qualidade da bebida de padrão duro para duro ácido.

A colheita dos frutos no estádio de maturação verde, depreciou a qualidade do café avaliados pelo número de defeitos e qualidade da bebida, conforme tabela 3. Nesta tabela, verificou-se que a medida que a temperatura de secagem aumentava; o número de defeitos, a gravidade dos defeitos e a depreciação da qualidade da bebida aumentavam. A temperatura de secagem de 30°C não foi observada a presença de grãos preto e preto-verdes, sendo que a 45°C encontrou-se 10,7% e 6,3% de grãos pretos e preto-verdes (tabela 3).

Quando os frutos verdes foram secados a 60°C, os grãos resultantes apresentavam 96,9% de defeitos preto-verdes e 3,1% de defeito verdes. Observou-se ainda que o número de defeitos atingiu o valor 1800 e a bebida resultante destes grãos apresentava-se imprópria para consumo, conforme tabela 3.

Observando a tabela 4, verificou-se que os valores de condutividade elétrica e lixiviação de potássio foram significativamente maiores para os grãos resultantes de frutos colhidos no estádio de maturação verde comparados com as cerejas, em todas as temperaturas de secagem.

Nesta tabela 4, observou-se que a medida que se elevou a temperatura de secagem os grãos resultantes apresentavam maiores condutividade elétrica do exsudato e lixiviação de potássio. Este comportamento foi mais nítido para os frutos colhidos verdes; enquanto que os frutos colhidos no estádio cereja não diferiram quanto a condutividade elétrica quando secados até 45°C, mas tiveram a qualidade da bebida, a condutividade elétrica e a lixiviação de potássio alteradas significativamente quando secados a 60°C.

Tabela 3. Valores em percentagem em peso de grãos normais, verdes verde-escuros, pretos e preto verdes, número de defeitos e qualidade da bebida de amostras de café colhidos no estádio de maturação verde e cereja submetidas a diferentes temperaturas de secagem.

Estádio de Maturação	Tempo secagem	Normais	Verdes	Verde Escuro	Preto	Preto Verdes	Número de Defeitos	Qualidade da Bebida
		%						
Verde	20°C	7,5	92,5	-	-	-	480	Duro (Verde)
	30°C	7,7	86,0	6,3	-	-	540	Duro (Verde/Ácido)
	45°C	6,9	56,7	18,4	6,3	11,7	705	Duro (Verde/Ácido)
	60°C	-	3,1	-	-	96,9	1800	Impróprio p/ consumo
Cereja	20°C	100	-	-	-	-	-	Ap. Mole
	30°C	100	-	-	-	-	-	Duro
	45°C	100	-	-	-	-	-	Duro
	60°C	100	-	-	-	-	-	Duro (Ácido)

Tabela 4. Valores de condutividade elétrica do exsudato e lixiviação de potássio de amostras de café colhidos no estádio de maturação verde e cereja submetidas a diferentes temperaturas de secagem.

Temperaturas de	Condutividade Elétrica ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$)		Lixiviação de Potássio ppm/g	
Secagem	Cerejá	Verde	ereja	Verde
20°C	36,19 Aa	52,60 Ba	14.67 Aa	21,11 Ba
30°C	44,78 Aab	103,85 Bb	18,30 Aa	42,49 Bb
45°C	58,47 Aab	170,69 Bc	26,44 Ab	65,28 Bc
60°C	83,95 Ac	304,44 Bd	36,73 Ac	113,29 Bd
Média	55,85	157,89	24,03	60,54
DMS 5% Maturação	13,33		5,19	
DMS 5% (Temperatura)	17,54		6,84	

Medias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas e letras minúsculas nas colunas, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

Efeito de locais e tipos de colheita sobre a condutividade elétrica de exsudatos de grãos de café A análise de variância dos dados de condutividade elétrica e qualidade da bebida de amostras de café, colhidos em diferentes locais, sob diferentes métodos de colheita, revelou valores de "F" significativos. A análise de variância revelou ainda valores de "F" significativos entre os locais de prova de qualidade da bebida e para todas as interações analisadas. Na tabela 5 e 6, pode-se observar que em todos os locais de colheita o café colhido no estádio cereja, seguido de despolpamento apresentou qualidade de bebida e tipo superior aos cafés mistura e de varrição. O comportamento quanto a qualidade da bebida, entre os cafés mistura e varrição diferiu conforme o local de colheita e local de avaliação da qualidade sensorial (prova de xícara).

A análise dos valores de condutividade elétrica obtidos, de acordo com a tabela 7, confirmam a superioridade do café despolpado, independente do local de colheita. Quanto aos cafés mistura e variação, estes tiveram um comportamento variável conforme o local de colheita, explicando as interações significativas encontradas.

Para cada local de avaliação da qualidade de bebida, os dados de condutividade elétrica e o padrão de bebida foram relacionados estatisticamente. Estas análises revelaram que existe uma relação inversa entre qualidade de bebida e condutividade elétrica conforme figura, que relacionam os padrões de bebida com os intervalos de confiança dos dados de condutividade elétrica do exsudato.

Tabela 5. Valores ou escore para qualidade da bebida de amostras de café provenientes de diferentes localidade e diferentes métodos de colheita e processamento.

Locais	Locais da Prova de	Método de Colheita		
	"Xícara" *	Despolpado	Mistura	Varrição
1. Patrocínio MG	1	12,36 A	10,20 B	9.72 B
	2	13.20 A	11.80 AB	11.60 B
	3	15.60 A	11.00 B	11.00 B
2. Mococa SP	1	14.60 A	10.84 B	10.68 B
	2	13.60 A	11.80 A	11.00 B
	3	11.00 A	9.63 A	9.08 B
3. Machado MG	1	15.20 A	11.00 B	10.56 B
	2	11.40 A	11.00 A	11.00 A
	3	13.80 A	11.00 B	10.28 B
4. Campinas SP	1	15.00 A	10.84 B	8.60 B
	2	12.80 A	11.00 B	11.00 B
	3	13.80 A	11.00 B	11.00 B
5. Garça SP	1	13.60 A	7.80 B	7.80 B
	2	14.60 A	11.40 B	11.80 B
	3	11.40 A	11.00 A	10.20 A
6. Pindorama SP	1	12.83 A	9.08 AB	9.23 B
	2	14.20 A	12.40 AB	10.20 B
	3	10.20 A	10.04 AB	7.08 B
7. Piracicaba SP	1	14.80 A	8.76 B	7.48 B
	2	12.60 A	11.80 A	8.60 B
	3	11.00 A	11.00 A	7.48 B
8. Maringá PR	1	13.32 A	9.72 B	5.08 C
	2	13.80 A	11.00 B	7.40 C
	3	11.40 A	9.63 A	9.08 B
9. Londrina PR	1	14.03 A	10.68 B	4.84 C
	2	11.80 A	11.40 A	6.60 B
	3	11.00 A	9.40 A	5.80 B
10. Alfenas MG	1	15.63 A	11.40 B	2.76 C
	2	11.40 A	11.00 A	1.00 B
	3	12.40 A	10.20 A	5.80 B

*1. FEMECAP Campinas - SP / 3. UNICAFE - Londrina - PR
2. BMF - São Paulo - SP
Médias seguidas por letras distintas nas linhas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

Tabela 7. Valores de condutividade elétrica do exsudato em ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$) de amostras de café provenientes de diferentes locais de produção e métodos de colheita durante a safra 91/92.

Locais de	Método de Colheita		
Produção	Despolpado	Mistura	Varrição
1. Patrocínio	98,37 A	88,46 A	107,84 A
2. Mococa	103,30 A	125,66 B	134,03 B
3. Machado	80,96 A	118,15 B	109,21 B
4. Campinas	123,19 A	137,27 A	163,30 B
5. Garça	117,31 A	132,89 B	123,78 B
6. Pindorama	96,43 A	89,73 A	109,37 A
7. Piracicaba	108,08 A	168,00 C	136,81 B
8. Maringá	133,07 A	192,13 C	158,04 B
9. Londrina	105,25 A	161,46 B	143,83 B
10. Alfenas	112,93 A	124,18 A	173,58 B

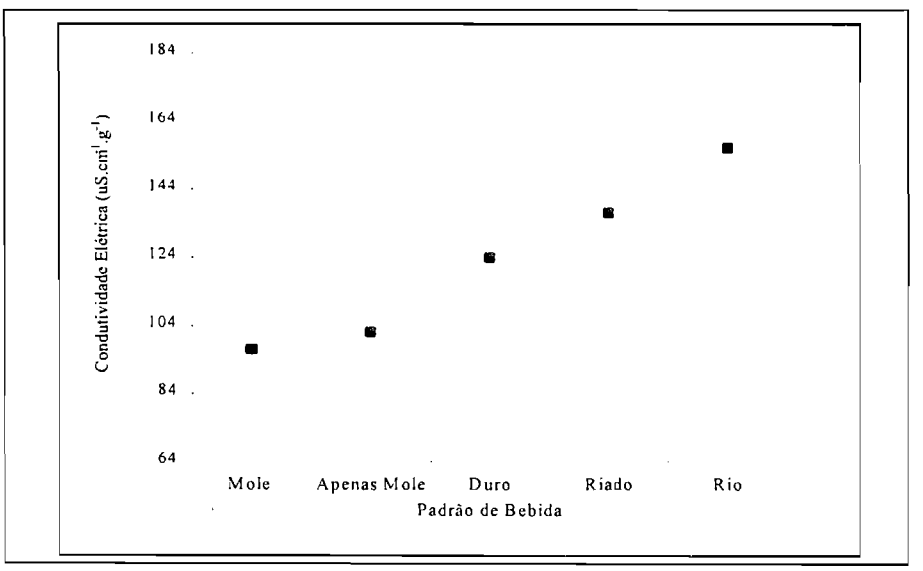
Médias seguidas por letras distintas na linhas diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade do Teste de Tukey.

Tabela 6. Número de defeitos de amostra de café provenientes de diferentes locais de produção e métodos de colheitas durante a safra 91/92.

Locais de	Método de Colheita		
Produção	**Despolpado**	**Mistura**	**Varrição**
1. Patrocínio	8 A	86 B	83 B
2. Mococa	34 A	208 C	166 B
3. Machado	21 A	100 B	112 C
4. Campinas	34 A	152 B	360 C
5. Garça	19 A	46 C	34 B
6. Pindorama	41 A	113 C	79 B
7. Piracicaba	20 A	297 C	224 B
8. Maringá	70 A	77 A	82 A
9. Londrina	16 A	240 C	90 B
10. Alfenas	23 A	78 B	115 C

Médias seguidas por letras distintas na linhas diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade do Teste de Tukey.

Figura 6. Relação entre padrão de bebida (1 - Mole; 2 - Apenas Mole; 3 - Duro; 4 - Riado e 5 - Rio) avaliadas em Campinas e intervalos de confiança dos valores de condutividade elétrica de 150 amostras de café.



CONCLUSÃO

- A condutividade elétrica sofre efeito marcante dos defeitos dos grãos de café (grãos preto-verdes, preto, ardidos, verdes e brocados) pois esta seqüência corresponde a ordem de importância da degradação do sistema de membranas.
- O acréscimo de frutos colhidos no estádio de maturação verde deprecia a qualidade do café, muito mais se estes frutos forem submetidos à secagem sob temperaturas superiores a 45°C e avaliados pelo teste de condutividade elétrica.
-O despolpamento dos frutos propiciou a obtenção de cafés de melhor qualidade (melhor bebida, menor número de defeitos menor
-condutividade elétrica) em todos os dez locais de colheita.
-Existe uma relação inversa entre padrão de bebida e condutividade elétrica ou seja quanto melhor a qualidade da bebida, menores os valores de condutividade elétrica dos exsudatos de grãos crus de café.

LITERATURA CITADA

Abdul-Baki, A. A., e Anderson, J. D. 1972. Physiological and biochemical deterioration of seeds. p.283-315. *In* T. T. Kozlowski (ed.) Seed Biology. Acad. Press, New York, NY.

morim, H. V. 1978. Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade. Piracicaba, SP, 85p. (Livre-Docência Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

Amorim, H. V., e Mello, M. 1992. Significance of Enzymes in Nonalcoholic Coffee Beverage. p.189-209 *In* P. F. Fox (ed.) Food Enzymology. Elsevier , London.

Amorim, H. V., e Silva, D. M. 1968. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. Nature. 219:381-382.

Ministério da Agricultura. 1976. Regras para análise de sementes. Deptº. Nac. Veg. DISEM. 188p.

Clifford, M. N. 1985. Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. p.305-359. *In* M. N. Clifford e K. C. Wilson (ed.) Coffee, Botany, Brochemsitry and roduction of Beans and Beverage. Croom helm, London.

Garruti, R. S., e Conagin, A. 1961. Escala de valores para avaliação da qualidade de bebida de café. Bragantia 20:557-562.

Illy, E., Brumen, G., Mastropasqua, L., e Maughan, W. 1982. Study on the characteristics and the industrial sorting of defective beans in green coffee lots. p.99-128. *In* Coloquio Científico Internacional sobre o Café, 10. Salvador, BA.

Loeffler, T. M., Tekrony, D. M., e Egli, D.B. 1988. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. Journal of Seed Technology 12:37-53.

Mathews, S., e Bradnock, W. T. 1968. Relationship between seed exudation and field emergence in peas and french beans. Hort. Res. 8:89-93.

Miya, E. E., Garrut, R. S., Chaib, M. A., Angelucci, E., Figuereido, I., e Shirose, I. 1973/4. Defeitos do café e qualidade da bebida. Col. Int. Tecn. Alim. 5:417-432.

McDonald Jr., M. B., e Wilson, D. O. 1979. An assessment of the standadization and the ability of the ASA-610 to rapidly predict potential soybean germination. Journal of Seed Techology 4: 01-11.

Ministério da Agricultura. 1976. Regras para análise de sementes. Deptº. Nac. Veg. DISEM. 188p.

Powell, A. A. 1986. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. Journal of Seed Technology 10:81-100.

Steere, W. C., Leveengood, W. C., e Bondie, J. M. 1981. An eletronic for evaluating seed germinaion and vigor. Seed Science and Technology 9:567-576.

Teixeira, A. A., Pereira, L. S. P., e Pinto, J. C. A. 1974. Classificação de café. Noções Gerais. IBC/GERCA - RJ, 88P.

Yaklich, R. W., Kulik, M. M., e Anderson, J. D. 1979. Evaluation of vigor tests in soybean seeds: relationship of ATP, conductibity and radioactive tracer multiple interia laboratory tests to field performance. Crop Science 19:806-810.

RELAÇÃO ENTRE O PESO E A CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE GRÃOS DE CAFÉ DE PROGÊNIES DE ICATU.

Prete[1], C.E.C.; Sera[2], T. e Fonseca[1], I.C.B.

[1]Professores do Departamento de Agronomia/Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brasil.
[2]Pesquisador do Instituto Agronômico do Paraná, Londrina - PR, Brasil.

SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN THE WEIGHT AND THE ELECTRIC CONDUCTIVITY OF COFFEE BEANS OF PROGENIES OF ICATU.

In this study, 500 weight and electric conductivity analysis of 23 coffee progenies cv Icatu were correlated. The samples were obtained of competition assay conducted in the Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, in july 1993. After the harvest the fruits were peeled for retreat of the pulp and drying until humidity degrees close of 11% w.b. Each portion was handled in sample mills, and 4 repetitions of 50 grains of each sample were picked, and accurately weighed in a scale of two decimals. After weighting, each sample was immersed in 75 ml of deionized water at 25°C for 3.5 hours, followed by electric condutivity determination expressed in μS.cm-1.g-1. The correlation was negative between the weight of grains and electric conductivity variables, which was significant at the level of 5% of probability; but with little intensity (r = -0,28). The result confirm the tendency that as larger and heavier the coffee beans higher the probabilitiy of obtaining a good quality beverage. However this relationship not reach the sufficient intensity to predict the quality, suggesting that a use of this hypothesis in programs of improvement of coffee is not recommended.

INTRODUÇÃO

Popularmente é aceito que grãos de café de tamanhos grandes são indicadores de boa qualidade de bebida. Evidentemente grãos de café bem formados, com pleno desenvolvimento, com o máximo de acúmulo de nutrientes e matéria seca proporcionarão um lote com menor número de defeitos que grãos miúdos, podendo esta característica refletir na qualidade da bebida.

Lazarini e Moraes (1958) e Teixeira et al (1974) encontraram uma maior concentração de defeitos a medida que a classe de tamanho dos grãos ou, peneiras, do café diminuía, pois a probabilidade de encontrarmos defeitos verdes, pretos e ardidos, é maior nas porções de cafés mal formados ou de menores peneiras.

Roche (1995) avaliou 15 cultivares de café produzidos no Hawaii e não encontrou correlação entre o tamanho dos grãos e qualidade da bebida, concluindo que o tamanho dos grãos não era um bom indicador da qualidade da bebida quando comparava cultivares de uma única área de produção.

O objetivo deste trabalho foi verificar a hipótese de que quanto maior o peso dos grãos melhor é a qualidade do café, avaliada indiretamente pelo teste de condutividade elétrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram correlacionadas 500 observações entre o peso de grãos e a condutividade elétrica de 23 progênies de café cv. Icatu. As amostras para determinação dos dados foram obtidas de um ensaio de competição de progênies das gerações F3, F4, F5 e F6 de retrocruzamento 2, dos ensaios de Icatu conduzidas pelo IAPAR. Os frutos cerejas foram coletados na primeira quinzena de junho de 1993. E a seguir foram descascados para retirada do endocarpo, obtendo assim "cerejas descascadas" que foram secos em terreiro até atingirem grau de umidade próximo de 11%. Cada parcela obtida foi beneficiada em moinho para amostras e os grãos de café obtidos foram pesados em balança com precisão de duas casas decimais.

Após a pesagem de cada amostra de 50 grãos foi imersa em 75 ml de água deionizada, à 25°C por 3,5 horas de embebição seguida de leitura em condutivímetro elétrico DIGIMED CD-21 expressando os resultados em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$.

A análise de correlação foi feita utilizando-se o programa "Statistica for Windows" (1993), versão 4.3.

RESULTADOS

Os resultados da análise podem ser vistos na Figura 1.

A correlação entre as variáveis peso de grãos e condutividade elétrica foi negativa e significativa no nível de 5% de probabilidade, ou seja, quanto maior o tamanho dos grãos há tendência de menores valores de condutividade elétrica, indicando indiretamente melhor qualidade da bebida do café (Prete, 1992).

No entanto esta correlação foi pouco intensa r = -0,28, necessitando de estudos para possibilitar a utilização segura desta característica, maiores tamanhos de grãos, como indicador da seleção de progênies superiores quanto a qualidade da bebida em programas de melhoramento.

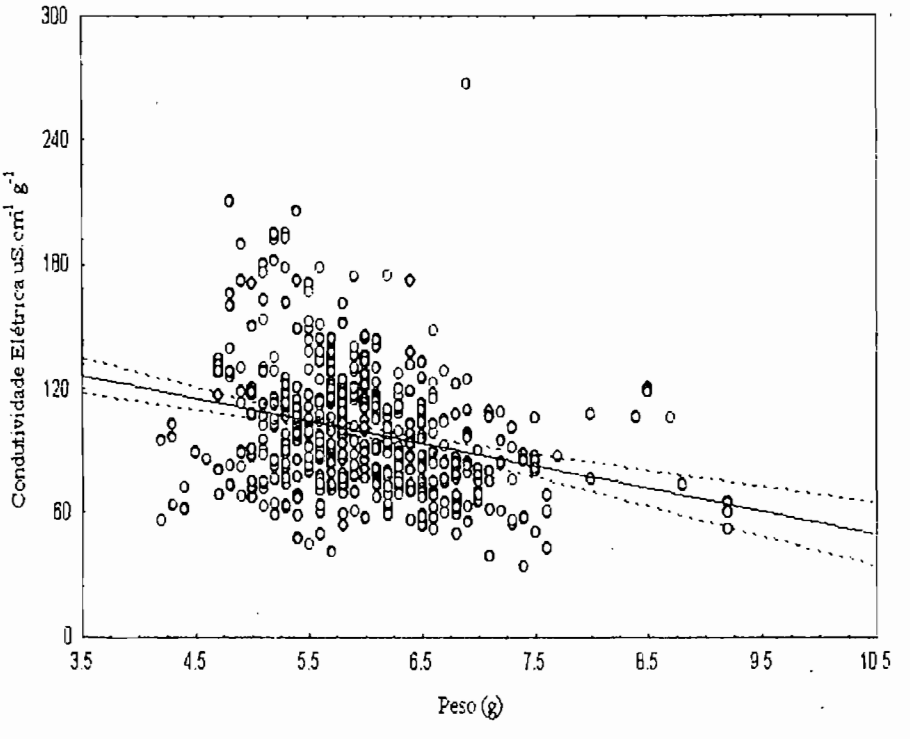


Figura 1. Representação gráfica da correlação entre peso dos grãos de café e condutividade elétrica.

CONCLUSÃO

Existe uma correlação negativa mas pouco interessa (r = -0,28) entre o peso dos grãos e a condutividade elétrica de grãos de café de progênies de Icatu, devendo a característica tamanho de grãos ser utilizada com cautela na seleção de progênies superiores em programas de melhoramento de café.

LITERATURA CITADA

Lazarini, W., e Moraes, F. R. P. 1958. Influência dos grãos deteriorados "tipo" sobre a qualidade da bebida de café. Bragantia 7:109-118.

Prete, C. E. C. 1992. Condutividade elétrica dos exsudatos de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida. Piracicaba, SP, 125p. (Tese de Doutorado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

Roche, D. 1995. Coffee genectics and quality. v.2. p.584-588. In Seizieme Colloque Scientifique International sur le Cafe. Kyoto, Japon.

Teixeira, A. A., Pereira, L. S. P., e Pinto, J. C. A. 1974. Classificação de café. Noções gerais. IBC/GERCA - RJ. 88p.

Statsoft. Programa: STATISTICA for Windows (software). Versão 4.3 B, 1993.

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE EXSUDATOS DE GRÃOS DE CAFÉ COLHIDOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO.

Prete[1], C.E.C.; Sera[2], T.; Crudi[3], C.E. e Fonseca[1], I.C.B.

[1] Professores do Departamento de Agronomia/Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brasil.
[2] Pesquisador do Instituto Agronômico do Paraná, Londrina - PR, Brasil.
[3] Estagiário do Curso de Agronomia/Universidade Estadual de Londrina.

SUMMARY

ELECTRIC CONDUCTIVITY OF EXSUDATES OF COFFEE BEANS HARVESTED IN DIFFERENT STAGES OF MATURATION.

This work was developed with the objective to verify the effect of different stages of coffee maturation on the values of electric conductivity, which causes inverse relation on the beverage quality. The fruits of coffee cv. Red Catuai were harvested in different stage of maturation: green, green-cane, cherry (ripe), raisin stage and dry stage in the Agronomic Institute of Paraná/Londrina during July, 1993. Four replications of 2 liters of fruits were picked for each maturation stage. The fruits were placed to dry on sieves with periodic shaking until reach 11% of humidity. Soon after the samples were hulled and each portion separated in four samples of 50 grains were weighted, immersed in 75 ml of distilled water at 25°C for 3.5 hours, followed by electric condutivity determination, expressed in μS.cm-1.g-1. For each maturation stage the following medium values of electric conductivity were obtained: green, 149.24 μS.cm-1.g-1; green-cane, 105.72 μS.cm-1.g-1; cherry, 76.62 μS.cm-1.g-1; raisin, 79.60 μS.cm-1.g-1; and dry, 76.04 μS.cm-1.g-1. The statistical analysis of the data indicates that the fruits harvested in the green and green-cane stage had significantly inferior quality, once as larger the values of electric conductivity, worst were the qualities of the beverage. The results confirm the need to begin the crop harvest with the smallest possible percentage of green fruits, with intention to preserve the quality of the coffee beans.

INTRODUÇÃO

O aumento na procura de cafés de qualidade superior fez com que o Brasil perdesse uma parcela significativa do mercado externo. Para a obtenção de um café de boa qualidade é necessário a aplicação de técnicas adequadas de colheitas e preparo do café, facilitando dessa forma sua comercialização e obtendo maiores retornos econômicos. Sendo assim a melhor época de realizar a colheita é quando o café apresenta-se em seu ponto ótimo de maturação (maturação fisiológica), isto é, nos estádios de cereja. Caso a colheita seja realizada precocemente, nos estádios verde e verde-cana, aparecerá um grande número de grãos verdes o que depreciará a qualidade do café. O café por apresentar mais de uma floração, proporciona numa mesma planta, frutos em diferentes fases de maturação, sendo assim importante efetuar a colheita no momento em que a maioria desses frutos se encontrarem no ponto ideal de maturação que é o estádio de cereja.

Ao trabalharem com cafés em vários estádios de maturação como verde, verde-cana, cereja, passa e seco, Freire e Miguel (1985), demonstraram que a máxima qualidade do fruto se dá no estádio cereja; já o café colhido precocemente com grande percentual de verde, além de proporcionar prejuízo no tipo e bebida, poderá também atingir um índice de 20% de perdas em relação ao rendimento final. Para Teixeira (1984), o café colhido no estádio de maturação verde apresenta aspecto de torração de pior qualidade, com conseqüente inferioridade na qualidade de bebida, além de apresentarem menor peso e tamanho dos grãos.

As transformações bioquímicas indesejáveis que ocorrem no grão de fruto verde, antes e após a colheita, e que conduzem a formação de uma bebida inferior, são principalmente de natureza enzimática, envolvendo a polifenoloxidase, glicosidase, lipase e protease. Algumas dessas transformações bioquímicas degradam as paredes e membranas celulares, outras podem mudar a colaboração do grão e da película prateada, estando a qualidade de bebida sensivelmente alterada por estas modificações (Amorim e Teixeira, 1975).

Em sua tese de mestrado, Pimenta (1995), demonstrou através de análises físico-químicas que entre grãos no estádio cereja, passa e seco as diferenças dos teores de acidez titulável, sólidos solúveis, açúcares totais, compostos fenólicos,

polifenoloxidase e qualidade de bebida não apresentaram diferenças significativa.

Amorim (1978) constatou que cafés de pior qualidade influenciados pela presença do defeito verde apresentam valores mais elevados de lixiviação de potássio. Prete (1992), confirmou as observações de Amorim (1978) verificando que cafés com maiores quantidades de defeito verde apresentam maiores valores de condutividade elétrica.

O teor de acidez titulável em grãos de café pode variar de acordo com os níveis de fermentação que ocorrem nos grãos e também com os diferentes estádios de maturação dos mesmos, podendo também servir como suporte para auxiliar na avaliação da qualidade de bebida do café. Alguns autores como Arcila - Pulgarin e Valência - Aristizabal (1975), verificaram em seu trabalho que os frutos de café no estádio de maturação verde possuem menores teores de acidez titulável, que aumenta a medida que se intensifica o processo de maturação dos frutos.

Com relação aos prejuízos causados ao tipo do café, Nobre et al. (1980) através de experimento constatou que o melhor tipo ocorreu para os tratamentos cereja e passa. Notável tendência de desmerecimento do tipo do café (inferior a 8) foi observado para o tratamento verde, ficando intermediário o tipo no tratamento verde-cana. Em todos os cultivares testados, o tratamento verde foi o que apresentou menor porcentagem de grãos graúdos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. O tratamento verde-cana apresentou comportamento intermediário e os tratamentos cereja e passa apresentaram melhor desempenho.

Com base no conhecimento da influência do estádio de maturação dos frutos na qualidade do café, o presente trabalho tem por objetivo verificar o efeito de diferentes estádios de maturação do café sobre os valores de condutividade elétrica, a fim de avaliar o melhor estádio para realizar a colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Instituto Agronômico do Paraná de Londrina em 7 de julho de 1993, onde foram colhidos no pano, frutos de café cv. Catuaí Vermelho nos estádios de maturação: verde, verde-cana, cereja (maduro), passa e seco, sendo 4 repetições de 2 litros de frutos em cada estádio de maturação. Os frutos foram colocados para secar sobre peneiras com revolvimento periódico até atingirem umidade próxima a 11%. Após o beneficiamento dos grãos, realizou-se o teste de condutividade elétrica do exsutados desenvolvido por Prete (1992), que consiste na utilização de quatro amostras de 50 grãos de café, sem escolha, pesadas com precisão de 0,1g, imersas em 75 ml de água destilada (no interios de copos plásticos de 180 ml de capacidade), e colocadas em ambientes à 25°C por 3,5 horas, seguida de agitação e leitura em condutivímetro elétrico, expressando os resultados em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$

O estudo do efeito de diferentes estádios de maturação sobre os valores de condutividade elétrica foi realizado através da análise de variância complementada pelo teste de comparação múltipla de Tukey, no nível de 5% de significância.

RESULTADOS

No Quadro 1 encontram-se os resultados do teste de condutividade elétrica, onde pode ser constatado que os grãos no estádio cereja, passa e seco obtiveram os melhores resultados, ou seja, menores valores de condutividade elétrica, e não diferiram entre si significativamente. Já os frutos no estádio verde e verde-cana apresentaram condutividade elétrica elevada refletindo um maior dano ou degradação do sistema de membranas (desorganização do sistema de membranas), o que ocasiona uma maior lixiviação de íons..

Quadro 1. Condutividade elétrica média ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$) de exsudatos de grãos de café colhidos nos diferentes estádios de maturação.

Estádios de Maturação				
Verde	Verde Cana	Passa	Maduro	Seca
149,24 a (1)	105,73 b	79,60 c	76,63 c	76,04 c

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. DMS = 21,17 ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$)

O melhor desempenho do grão no estádio seco foi decorrente das condições climáticas secas, sem chuva, desfavorável ao desenvolvimento de patógenos que poderiam comprometer a qualidade dos frutos secos na planta.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos conclui-se que a colheita deve ser iniciada quando houver o mínimo de grãos verdes na planta, ainda que isso

implique no aumento do número de grãos secos na planta.

LITERATURA CITADA

Amorim, H. V. 1978. Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração da qualidade. Piracicaba, SP, 85p. (Livre-Docência Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

Amorim, H. V., e Teixeira, A. A. 1975. Transformações bioquímicas, químicas e físicas dos grãos de café verde e a qualidade da bebida. *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Curitiba, PR. p.21

Arcila-Pulgarin, J., e Valência-Aristizabal, G. 1975. Relaciòn entre la actividad de la polifenoloxidase (PFO) y las pruebas de cataciòn como medidas de la bebida de café. Cenicafé 26: 55-71.

Freire, A. C. F., e Miguel, A. C. 1985. Rendimento e qualidade do café colhido nos diversos estádios de maturação em Varginha-MG. *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 12. Caxambu, MG. p.210-214

Nobre, G, W., Teixeira, R. A. F., e Carvalho, C. H. S. 1980. Rendimento e qualidade do café em frutos colhidos em diferentes estádios de maturação. p.417-419. *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 8. Campos do Jordão, SP.

Pimenta, C. J. 1995. Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação (Dissertação de Mestrado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

Prete, C. E. C. 1992. Condutividade elétrica dos exsudatos de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida. Piracicaba, SP, 125p. (Tese de Doutorado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

Teixeira, A. A. 1984. Observações sobre várias características do café colhido verde e maduro. *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11. Londrina, PR. p.227-228

AVALIAÇÃO DE PROGÊNIES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. cv. Icatu) QUANTO A CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO EXSUDATO.

Prete[1], C.E.C.; Sera[2], T. e Fonseca[1], I.C.B.

[1]Professores do Departamento de Agronomia/Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, Brasil.
[2] Pesquisador do Instituto Agronômico do Paraná, Londrina - PR, Brasil.

SUMMARY

EVALUATION OF COFFEE Coffea Arabic L. cv. ICATU PROGENIES BY ELECTRIC CONDUCTIVITY OF EXSUDATE

With the objective to select promising strains, the quality of coffee cv. Icatú was evaluated indirectly by electric conductivity. The samples were obtained by an assay schedule using competition of 23 coffee cv. Icatú progenies cultivated in at Agronomic Institute of Paraná/Londrina, which were harvested during the month of July, 1993. As the quality pattern reference, the coffee cv. Red Bourbon was used. The samples were picked in a sieve, peeled to retreat the pulp, obtaining like this peeled cherries, that were dry in yard until humidity of 11% w.b. Each portion was handled in sample mills, and the obtained coffee beans weighted, immersed in 75 ml of deionized water (plastic glasses of 180 ml) and placed in a atmosphere of 25°C for 3.5 hours. After this time the electric conductivity of the samples were determined, and the results expressed in uS.cm-1.g-1. Except one strain, all of strains showed no difference each other when compared to the reference strain Red Bourbon. The strain Icatú no. 20 showed the lowest electric conductivity value, deserving more detailed studies to confirm its superior characteristics.

INTRODUÇÃO

Todos os atributos do café, incluindo o aroma e sabor da bebida são influenciados pelo ambiente e seus limites são determinados pelo genótipo.

Carvalho (1982) descreve a origem de cafeeiros do germoplasma Icatú, que em língua tupi significa bonança (Monaco et al., 1974). Foi obtido a partir do cruzamento inicial de *C. arabica* cv. Bourbon Vermelho com o *C. canephora* cv. Robusta em 1950 e de dois retrocruzamento para *C. arabica* cv. Mundo Novo, com seleções subsequentes praticadas nas gerações F2, F3 e F4 de polinizações livres das melhores plantas. Portanto, Icatu é um germoplasma que tem cerca de 87,5% dos genes de *C. arabica* e 12,5% de genes do *C. canephora.*

Apesar de ter genes de *C. canephora,* o Icatu tem apresentado qualidade de bebida semelhante a *C. arabica,* tanto em materiais com um ou com dois retrocruzamentos, levando a conclusão de que os fatores determinantes de qualidade de bebida devem ser dominates em relação aos de *C. canephora* (Fazuoli et al., 1977)

O café da variedade Icatu apresenta grande variabilidade entre e dentro progênies quanto a produtividade, vigor vegetativo, resistência a ferrugem, precocidade e uniformidade de maturação dos frutos e constituintes químicos dos grãos como a cafeína, ácido clorogênico e sólidos solúveis entre outros. Esta variabilidade é decorrente de sua origem híbrida entre *C. arabica* e *C. canephora.* Entretanto, pouco se sabe sobre sua variabilidade quanto a qualidade da bebida.

Para dificultar esta separação entre progênies, os atuais procedimentos de avaliação sensorial da qualidade do café estão baseados em parâmetros empíricos e subjetivos, pois dependem de sensações e habilidades pessoais, adquiridas com muitos anos de experiência.

Visando ampliar os procedimentos para avaliação da qualidade do café, Prete (1992) desenvolveu o teste de condutividade elétrica do exsudato de grãos de café, baseado em métodos físicos e químicos.

Comparando diferentes genótipos de café, Prete (1992) verificou que o cv. Icatu apresentou valores inferiores de qualidade em relação aos demais genótipos pelo teste de condutividade elétrica e pela "prova de xícara".

Devido a sua origem, o Icatu apresenta grande variabilidade, recombinando as diversas características de *C. canephora* e *C. arabica* (Cambrony, 1988), tais com produtividade (Fazuoli et al., 1981, 1983); vigor vegetativo (Ramos e Lima, 1980; Costa et al.. 1981), resistência à ferrugem (Costa, 1978; Eskes e Costa, 1980) e na composição química (Carvalho, 1982).

Estas características podem estar associadas com a qualidade da bebida de forma direta e/ou indireta e muitos aspectos ainda estão para ser elucidados em benefício da cafeicultura.

Assim este trabalho visa verificar, quantificar e selecionar as progênies de café cv. Icatu que apresentem melhores qualidades da bebida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas as melhores progênies F3, F4, F5 e F6 de retrocruzamento 2 dos ensaios de Icatu conduzidas pelo IAPAR, já em produção.

Foram escolhidas as seis melhores plantas de cada uma das 23 melhores progênies pela produtividade e outras características agronômicas.

Como testemunhas foram utilizadas as cultivares IAPAR-59 e Boubon Vermelho.

Os frutos cereja foram coletados numa única data para todas as plantas de todas as progênies e testemunhas na primeira quinzena de junho de 1993. A quantidade de frutos coletado foi de um litro que foi descascado e secado a sol sem a degomagem e depois testados pelo método da condutivida elétrica.

A determinação de condutividade elétrica do exsudato foi realizada conforme metodologia desenvolvida por Prete (1992) que consiste na utilização de quatro amostras de 50 grãos de café, sem escolha, pesados com precisão de 0,1 g, imersas em 75 ml de água destilada (no interior de copos de plásticos de 180 ml de capacidade) e colocadas em ambiente a 25°C por 3,5 horas, seguida de agitação e leitura em condutivímetro elétrico, expressando os resultados em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$ de amostra.

A avaliação dos progênies quanto a condutividade elétrica do exsudato foi feita através de análise de variância complementada pelo teste de comparação de médias de Tukey para delineamento inteiramente casualizado com 20 progênies Icatu e 2 cultivares testemunhas, Bourbon Vermelho e IAPAR-59.

RESULTADOS

Os resultados da análise estatística dos dados podem ser vistos no Quadro 1. A maior parte das progênies não diferiram entre si e das testemunhas Bourbon Vermelho e IAPAR-59, sendo que a linhagem Icatu 20 apresentou menor valor de condutividade elétrica sendo diferente apenas do Icatu 2 que apresentou o maior valor de condutividade.

Quadro 1. Condutividade elétrica média ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$) dos exsudatos das progênies do café Icatu e cultivares Bourbon Vermelho e IAPAR-59.

Progênie	Condutividade
ICATU 20	64,37 b
ICATU 10	70,27 ab
ICATU 5	77,76 ab
ICATU AMARELO 6	81,19 ab
ICATU 1	83,58 ab
ICATU 8	91,39 ab
ICATU 11	92,01 ab
ICATU 15	95,12 ab
ICATU 13	97,39 ab
ICATU VERMELHO 24	97,77 ab
ICATU 14	108,27 ab
ICATU VERMELHO19	109,54 ab
ICATU 23	112,29 ab
ICATU AMARELO 30	112,58 ab
ICATU VERMELHO 7	115,42 ab
ICATU TARDIO AMARELO 4	115,98 ab
ICATU AMARELO 28	122,14 ab
ICATU VERMELHO 17	122,16 ab
ICATU VERMELHO 22	124,33 ab
ICATU 2	128,75 a
BOURBON VERM. 9	74,72 ab
IAPAR-59 29	87,07 ab

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

DMS = 62,125 ($\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$)

CV = 25,86%

CONCLUSÃO

Os progênies de Icatu testadas possuem características semelhantes ao Bourbon Vermelho, sendo que a progênie Icatu 20 apresentou menor valor de condutividade elétrica, merecendo maiores estudos para confirmar suas possíveis características superiores.

LITERATURA CITADA

Cambrony, H. R. 1988. Arabusta and other interspecific fertile hybrids. p.263-291. *In* R. T. Clarke, e R. Macrae, Coffee. v.4 Agronomy.

Carvalho, A. 1982. Melhoramento do cafeeiro: Cruzamento entre C. arabica e C. canephora. p.363-368. *In* Dixieme Colloque Scientifique Internacional sur le café. Salvador, BA.

Costa, W. M. 1978. Relação entre grau de resistência a H. vastatrix e a produtividade do café Icatu. Bragantia 37:1-9.

Costa, W. M., Carvalho, A., e Fazuoli, L.C. 1981. Estudo de caracteres dentro de progênies do cafeeiro Icatu visando a sua seleção. p.169-73 *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 9. São Lourenço, RJ.

Eskes, A. B., e Costa, W. M. 1980. Characterization of incomplete resistance to Hemileia vastatrix in the Icatu coffe population. Euphytica 32:649-57.

Fazuoli, L. C., Carvalho, A., Monaco, L. C., e Teixeira, A. A. 1977. Qualidade da bebida do café Icatu. Bragantia 36:165-72.

Fazuoli, L. C., Carvalho, A., Costa, W. M., Nery, C., Laun, C. R. P., e Santiago, A. 1983. Avaliação de progênies e seleção no cafeeiro Icatu. Bragantia 42:179-89.

Fazuoli, L. C., Gallo, P. B., Carvalho, A., Costa, W. M., e Rocha, T. R. 1981. Seleção do café Icatu em Mococa. p.174-179. *In* Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 9. São Lourenço, RJ.

Monaco, L. C., Carvalho, A., e Fazuoli, L. C. 1974. Melhoramento do cafeeiro Germoplasma do café Icatu e seu potencial no melhoramento. p.103. *In* Congresso de Pesquisas Cafeeiras, 2. Poços de Caldas, MG.

Prete, C. E. C. 1992. Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (Coffea arabica L.) e sua relação com qualidade da bebida. Piracicaba, SP, 125p. (Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Ramos, L. C. S e Lima, M. M. A. 1980. Avaliação da superfície relativa do sistema radicular de cafeeiros. Bragantia 39:1-5.

MELHORIA DE QUALIDADE EM ÓLEO DE CAFÉ PELO USO DA EXTRAÇÃO ACELERADA COM SOLVENTE(ASE)

Jair S.S. Pinto[1], Fernando M. Lanças[1], Suzana L. Nixdorf[1], Paulo L. C. Oliveira[2]

[1]Laboratório de Cromatografia, Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo(USP), Cx. Postal 780, 13560-970 São Carlos-SP, Brasil; [2]Companhia Cacique de Café Solúvel SA, Cx. Postal 824, 86001-970 Londrina-PR, Brasil.

Palavras-chaves: *Óleo de café, extração acelerada por solvente (ASE), matéria graxa, determinação de teor de óleo, acidez.*

RESUMO

Comparativos na determinação de teores de óleo do café utilizando-se o sistema ASE e o extrator soxhlet (metodologia da AOAC) demonstraram resultados equivalentes, com um menor consumo de solvente (20mL) e uma redução no tempo análise (25 minutos) para o ASE, permitindo desta forma a melhoria nos processos industriais em função dos resultados analíticos mais rápidos fornecidos pelo laboratório.

INTRODUÇÃO

O óleo de café, obtido através da prensagem mecânica dos grãos de café torrado, é um produto natural com alto valor comercial agregado. Sua principal aplicação na indústria cosmética e alimentícia se deve a sua fragrância sendo utilizado para intensificar o odor de café em seus produtos. Como um produto de alta qualidade seu consumo e sua exportação dependem do cumprimento de certas especificações. A determinação do índice de acidez consiste em uma destas exigências[3]. A acidez, é a medida quantitativa do conteúdo dos ácidos graxos livres presentes no óleo, um importante indicador do estado de deterioração do produto revelando seu estado de conservação. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz sendo que a rancidez é quase sempre acompanhada pela formação destes ácidos graxos livres. O teor de acidez do óleo de café comercializado depende desde da escolha dos grãos de café utilizados em sua produção, os quais podem variar de acordo com a variedade de café selecionada, com a região e o solo onde o mesmo foi cultivado, com as condições climáticas a que foi submetido além do modo com que foi manuseado em sua colheita entre outros fatores, sendo que este índice pode sofrer elevação durante o processamento ou ainda na estocagem do óleo após sua extração. Assim, a matéria-prima deve ser primeiramente analisada, a fim de se verificar se a mesma é adequada para a obtenção de um produto final com baixa acidez. Para efetuar a análise do índice de acidez a extração prévia da matéria graxa ou teor de óleo é requerido a partir dos grãos de café cru. Portanto, este teor de óleo não é só necessário para o cumprimento de uma especificação descrita tendo que ser feito como pré-requisito para a análise de acidez, mas também é fundamental por fornecer parâmetros que permitam prever e monitorar o rendimento de extração do óleo de café no processo industrial. Como o setor produtivo depende dos resultados fornecidos pelo laboratório para a escolha da matéria prima a fim de iniciar o processo de extração, quanto mais rápido ocorrer o procedimento analítico com o repasse destas informações, tanto melhor. A extração acelerada com solvente (ASE) vem de encontro a esta necessidade[2]. A metodologia oficial atualmente adotada para a determinação de matéria graxa do café cru descrita pela AOAC utiliza soxhlet por 16 horas com 150mL de éter de petróleo como solvente. O ASE é um novo procedimento de extração que utiliza solventes orgânicos a alta pressão (1500-2000psi) e temperatura acima do ponto de ebulição (50-200°C)[4] para extrair rapidamente componentes de amostras sólidas ou semi-sólidas com menor consumo de solventes quando comparado às técnicas convencionais. Isto acontece pela redução na interação soluto-matriz com a quebra do equilíbrio superficial, ocorrendo uma maximização nas taxas de transferência de massa e solubilidade com redução da viscosidade e da tensão superficial do solvente. Este procedimento se insere no contexto atual que visa promover a minimização do emprego de solventes orgânicos, reduzindo a quantidade de resíduos descartados com uma menor exposição do analista a estes solventes, e ainda promovendo a redução do tempo de análise. Com esta finalidade um sistema de ASE foi projetado e construído, o qual prima pela simplicidade e funcionalidade com baixo custo, agregando valor ao trabalho de desenvolvimento de técnicas que facilitam o preparo de amostras, sendo o mesmo aplicado à extração da matéria graxa do café cru visando melhorar a qualidade do processo industrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sistema ASE

O sistema ASE construído (Figura 1) consiste de uma bomba pneumática, onde o solvente é colocado e pressurizado diretamente com nitrogênio (ou qualquer outro gás inerte); cela de extração de aço de diferentes tamanhos fechada com filtros de aço inox que evitam a passagem de partículas; válvulas que visam direcionar o solvente extrator ou o gás de purga antes e após a cela de extração; um sistema de aquecimento: um coletor e algumas conexões. O solvente pressurizado percola a amostra disposta na cela de extração promovendo a extração do material de interesse.

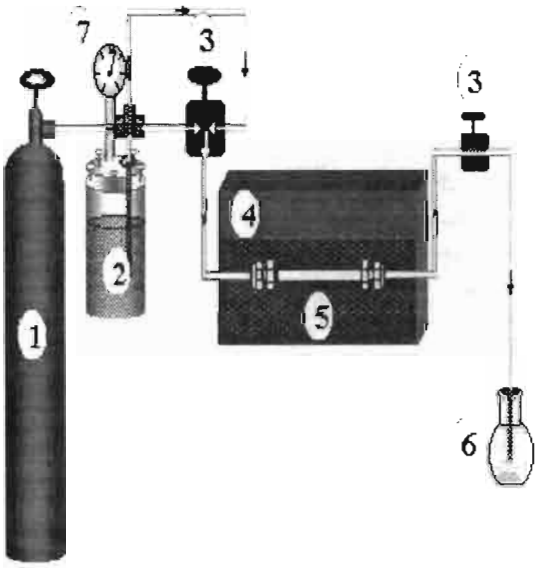


Figura 1 - Diagrama esquemático do sistema de extração acelerada com solvente (ASE) 1. Nitrogênio; 2. Vas pressurizador; (1+2 = Bomba pneumatica); 3. Válvulas; 4 Sistema de aquecimento; 5 Cela de extração com filtros; 6 Coletor. 7 Manômetro

Preparação das amostras

Cinqüenta gramas de grãos de café Arábica cru foram secos em estufa a 100°C por 5 horas, resfriados, triturados e passados em peneira malha 0,42 mm. As amostras foram cedidas pela Cia Cacique de Café Solúvel SA.

Extração em soxhlet [3]

Oito gramas de amostra de café previamente preparadas foram extraídas em soxhlet com 150 mL de éter de petróleo em chapa (30-60°C) por 8 horas. O solvente foi evaporado até completa secagem do resíduo em estufa (105°C) por aproximadamente 1 hora. O teor de óleo ou matéria graxa foi determinado gravimetricamente após resfriamento.

Extração ASE

O vaso pressurizador foi preenchido com éter de petróleo e pressurizado a 1500 psi com nitrogênio. Oito gramas de amostra de café previamente preparadas foram colocadas na cela de extração (0,8 x 30 cm) a qual foi transferida para o sistema de aquecimento mantido a 80°C. Inicialmente a cela foi preenchida com éter de petróleo aguardando-se por 5 minutos para que o equilíbrio térmico fosse atingido. Uma extração estática foi feita durante 10 minutos sendo que mais 10 minutos foram necessários para efetuar a extração dinâmica a um fluxo de aproximadamente 2mL/min. Após o término da extração o sistema foi purgado com nitrogênio para promover a eliminação do solvente da cela com sua completa transferência para o frasco coletor. O solvente da amostra extraída foi evaporado em rota-vapor sendo totalmente eliminado pela passagem de nitrogênio. O teor de óleo foi determinado gravimetricamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos na Tabela 1 demonstram a viabilidade do emprego do sistema proposto de ASE como alternativa ao método tradicionalmente utilizado de extração via soxhlet, pelo qual se obtém uma extração com uma eficiência de 95% em relação ao valor do método oficial. Se temperaturas mais altas forem empregadas valores mais próximos com um menor tempo de análise certamente serão obtidos. Comparações também demonstram uma redução no consumo de solvente em cerca de 7 vezes, bem como uma redução no tempo de análise em aproximadamente 20 vezes, cuja extração agora leva cerca de 25 min para ser realizada. Esta redução no tempo analítico permite que se efetue uma otimização nos parâmetros analíticos permitindo a validação das metodologias adotadas pelo laboratório, abrindo caminho para um monitoramento mais completo em todas as etapas do processo produtivo permitindo a investigação não somente da matéria-prima, mas também possibilitando uma melhoria na qualidade do óleo pelo conhecimento e controle das variáveis de processo. Uma outra vantagem é que o sistema pode ser automatizado pelo desenvolvimento de *hardware* e *software* que permitam o controle dos solventes dispensados através do acionamento das válvulas.

Tabela 1 – Extração de óleo de café

Método	Solvente	Volume (mL)	Tempo de extração (min)	Teor de óleo (%) (m/m)	Desvio padrão (n=2)
Soxhlet	Éter de Petróleo	150	480	16,23	-
ASE	Éter de Petróleo	20	25	15,27	0,15

CONCLUSÕES

O sistema desenvolvido permite uma economia de solvente e de tempo analítico com resultados equivalentes a metodologia oficialmente adotada para o teor de óleo de café. As novas condições analíticas empregadas permitem a validação de métodos e o monitoramento do processo industrial de produção possibilitando ainda a automatização dos dispositivos instrumentais utilizados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e a CAPES/PICD pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists Methods of Analysis of Thirteenth Edition. 1980. Washington DC. 15.033, p. 235.
2. Heemken, O. P.; Theobald, N. and Wenclawiak, B. W. 1997. Comparison of ASE and SFE, Sonication, and Methanolic Saponification Extractions for the Determination of Organic Micropollutants in Marine Particulate Matter. Anal. Chem. 69(11): 2171-2180.
3. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 1976. Vol. I. 2ª ed., SP, p. 36 e 189.
4. Richter, B.E.; Jones, B.A.; Ezzel, J.L. and Porter, N.L. 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. Anal. Chem. 68(6): 1033-1039. Corresponding author: Jair S.S. Pinto Laboratório de Cromatografia Instituto de Química de São Carlos (IQSC)

INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM CAFÉ

Marta Hiromi TANIWAKI[1], Andréia Aparecida BANHE[1], Beatriz Thie IAMANAKA[1]

[1] Instituto de Tecnologia de Alimentos – Av. Brasil, 2880 - CEP 13.072-001, Campinas – SP, Brasil

1. INTRODUÇÃO

O café é um produto agrícola de extrema importância econômica e social para o Brasil. O país vem ocupando a posição de maior produtor mundial, não significando, que o excelente desempenho em termos quantitativos seja acompanhado no aspecto qualitativo. O café passa por vários processos até chegar a ser consumido como bebida. Vários fatores contribuem para a qualidade final do café, entre eles a população microbiana presente e as condições de que fizeram uma ou outra espécie prevalecer. Existe uma associação de microrganismos presentes como patógenos de plantas, contaminantes da superfície do fruto, no solo e no suco da polpa. A ecologia microbiana é complexa e envolve uma sucessão de crescimento de bolores, leveduras e bactérias.

Vários fungos ocorrem sobre os frutos do cafeeiro no terreiro, acelerando o processo de fermentação dos frutos, entre eles espécies de *Fusarium, Cladosporium, Colletotrichum, Penicillium, Aspergillus, Trichoderma* e *Gliocladium* (Carvalho et al., 1997) tem sido encontrados.

É um fato conhecido que muitas espécies de fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* são capazes de produzir micotoxinas, metabólitos tóxicos com efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. A ocratoxina A, com potencial carcinogênico e nefrotóxico tem sido encontrada em algumas amostras de café provenientes do Brasil e esse fato tem despertado muito interesse, especialmente, pelos países que importam café do Brasil. A ocratoxina é produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium,* que normalmente contaminam o café e outros grãos (Levi et al., 1974; Micco et al., 1987). Dentre as espécies de *Aspergillus* destacam-se *A. ochraceus* e as espécies relacionadas *A. alliaceus, A. meleus* e *A. suphureus.* A espécie *A. ochraceus* foi chamada de *A. allutaceus* por Samson & Gams (1985), contudo mais, recentemente, houve um acordo de que o nome mais apropriado para esta espécie é *A. ochraceus* (Pitt & Samson, 1993). Outras espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina incluem: *A. niger, A. carbonarius* e *A. terreus* (Heenan et al., 1998). Das espécies de *Penicillium, P. verrucosum* é o maior produtor de ocratoxina em climas temperados. Originalmente, o fungo produtor de ocratoxina foi identificado como *P. viridicatum,* contudo Pitt (1987) demonstrou que a espécie de *Penicillium* produtora de ocratoxina é *P. verrucosum.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

Amostras de café, variedade arábica, com aproximadamente 500 g, foram coletadas em uma fazenda de Patrocínio – MG, nas fases de: árvore, colheita com pano, colheita de varreção, café bóia, no lavador, no terreiro com vários dias de secagem e na tulha. As amostras foram embaladas em saco plástico estéril e transportadas em isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

2.2 Plaqueamento das amostras

Os grãos de café descascado e a casca do café passaram por uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio 0,4%, por 2 min. As amostras foram plaqueadas em seguida, no meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e Dicloran 18% Glicerol (DG18) de acordo com a técnica de Pitt & Hocking (1997). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias.

2.3 Identificação dos fungos

Para a identificação dos fungos as chaves seguidas foram: gênero *Penicillium* (Pitt, 1991; Samson et al., 1996); *Aspergillus* (Klich & Pitt, 1988); *Fusarium* (Burgess et al., 1994); e outros fungos (Domsch et al., 1993; Samson et al., 1996; Pitt & Hocking, 1997).

2.4 Teste de produção de ocratoxina

O teste de produção de ocratoxina pelo fungo *A. ochraceus* isolado no presente trabalho, seguiu a técnica de Davis *et al.,* 1966. O fungo foi cultivado em meio YES e extraído com clorofórmio. O extrato foi analisado em cromatografia de camada delgada sob luz ultravioleta, usando como solvente de desenvolvimento tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (90%) (5:4:1 v/v) conforme Scott *et al.,* 1970).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência de fungos em café descascado e na casca do café, desde a árvore até a armazenagem, em duas épocas de colheita é apresentada nas **Tabelas 1 a 4.**

Tabela 1. Ocorrência de fungos em café descascado, da árvore à tulha (1ª colheita).

Fungos	**Arvore n (%)**	**Pano n (%)**	**Varreção n (%)**	**Bóia n(%)**	**Lavador n (%)**	**Terreiro (1 dia) n (%)**	**Terreiro (2dias) n (%)**	**Terreiro (3 dias) n (%)**	**Terreiro (4 dias) n (%)**	**Tulha (30 dias) (%)**
Aspergillus niger										1 (1,2)
Aureobasidium *pullulans*	1 (1,2)					3 (3,7)				
Cladosporium sphaerospermum		4 (5,0)	2 2,5)			2 (2,5)				
Cladosporium sp								3 (3,7)		
Epicoccum nigrum							2 (2,5)			
Fusarium incarnatum						1 (1,2)				1 (1,2)
F. graminearum		1 (1,2)		3 (3,7)						
Fusarium oxysporum			1 (1,2)							
Fusarium sp		2 (2,5)			7 (8,75)	2 (2,5)				
Khuskia oryzae										2 (2,5)
Mucor racemosus		1 (1,25)	13 (16,25)	24 (30,0					2 (2,5)	1 (1,2)
Mucor sp								2 (2,5)		
Penicillium *brevicompactum*			1 (1,25)							
Penicillium sp	1 (1,2)					1 (1,2)				
Eupenicillium sp						1 (1,2)				
Phoma suberbarum	1 (1,2)									
Leveduras		2 (2,5)	11 (13,7)	8 (10,0			40 (50,0)	35 (43,7)	64 (80,0)	
Fungos dematiáceos		2 (2,5)	1 (1,25)							

Tabela 2. Ocorrência de fungos na casca do café, da árvore ao terreiro (1ª colheita).

Fungos	Árvore n (%)	Pano n (%)	Varreção n (%)	Bóia n (%)	Lavador n (%)	Terreiro (1 dia) n (%)	Terreiro (2dias) n (%)	Terreiro (3 dias) n (%)	Terreiro (4 dias) n (%)
Alternaria alternata	4 (5,0)	11 (13,7)				5 (6,25)	56 (70,0)	9 (11,2)	25 (31,2)
Aureobasidium *Pullulans*	3 (3,75)					8 (!0,0)	4 (5,0)		
Chaetomium *Globosum*		8 (10,0)							
Cladosporium Sphaerospermum	1 (1,25)								
Cladosporium sp		17 (21,2)	3 (3,7)			25 (31,2)	1 (1,2)	42 (52,5)	2 (2,5)
Colletotrichum *Gloeosporioides*					16 (20,0)				
Eurotium chevalieri									1 (1,2)
Fusarium incarnatum		1 (1,2)							
Fusarium sp		8 (10,0)	1 (1,2)		4 (5,0)		10 (12,5)	5 (6,2)	
Khuskia oryzae		1 (1,2)							
Mucor racemosus			5 (6,2)						1 (1,2)
Mucor sp		1 (1,2)		80 (100,0)				4 (5,0)	
Myrothecium Leucotrichum	1 (1,25)								
Nigrospora sphaerica		2 (2,5)							
Nigrospora sp	2 (2,5)								
Penicillium sp	6 (7,5)	1 (1,2)			1 (1,2)			1 (1,25)	
Phoma eupyrena		6 (7,5)							
Phoma sorghina	3 (3,7)	5 (6,2)				18 (22,5)		2 (2,5)	
Leveduras					2 (2,5)		4 (5,0)	32 (40,0)	44 (55,0)
Fungos dematiáceos	2 (2,5)	9 (11,2)			9 (11,2)	16 (20,0)		1 (1,25)	11 (13,7)

Na fase da colheita até a tulha, houve uma predominância das espécies de *Cladosporium, Mucor, Fusarium, Alternaria, Phoma, Khuskia, Colletotrichum* e outros fungos dematiáceos não identificados. Este fato se deve, principalmente, porque nesta fase o café apresenta uma alta umidade e os fungos não xerofílicos predominam nesta etapa. O café da fase bóia apresentou uma infecção fúngica de 100% das sementes plaqueadas, provavelmente, devido a sua alta umidade.

Com o aumento do tempo de armazenamento, provavelmente, as espécies xerofílicas de *Aspergillus* e *Eurotium* se tornarão mais comuns. *Aspergillus ochraceus* foi encontrado em apenas uma amostra (Tabela 3) na colheita com o pano. Teste de produção de toxina com a espécie de *A. ochraceus* isolada, demonstrou que esta espécie é produtora de ocratoxina A. Provavelmente, esta espécie estava presente no solo, contudo não houve uma proliferação de *A. ochraceus* após a

fase de colheita. Nesta fazenda as condições de colheita, secagem e armazenamento eram bem controladas e as práticas agrícolas estavam sendo executadas corretamente. Além disso, a região de Patrocínio é uma região seca durante a colheita, o que dificulta a proliferação das espécies fúngicas no café.

Tabela 3. Ocorrência de fungos em café descascado, da árvore à tulha (2ª colheita).

Fungos	Árvore n (%)	Pano n (%)	Varreção n (%)	Bóia n (%)	Lavador n (%)	Terreiro (1 dia) n (%)	Terreiro (2dias) n (%)	Terreiro (3 dias) n (%)	Terreiro (4 dias) n (%)	Tulha (30 dias) n (%)
Alternaria alternata					1 (1,2)					1 (1,2)
Aspergillus flavus				2 (2,5)						
Aspergillus Niger				1 (1,2)						
Aspergillus ochraceus		1 (1,2)								
Chaetomium sp		2 (2,5)	2 (2,5)				1 (1,2)			
Cladosporium Sphaerospermum	2 (2,5)									
Cladosporium sp		2 (2,5)		1 (1,2)			3 (3,7)			
Cyclothyrium sp		1 (1,2)								
Epicoccum nigrum		1 (1,2)								
Fusarium incarnatum	2 (2,5)	8 (10)	7 (8,7)	16 (20.0	1 (1,2)	4 (5,0)		3 (3,7)	3 (3,7)	12 (15,0)
Mucor sp	1 (1,2)	2 (2,5)			1 (1,2)					
Neurospora sithophila							1 (1,2)			
Nigrospora sp							2 (2,5)	1 (1,2)		
Penicillium brevicompactum	1 (1,2)									
Trichoderma harzianum					1 (1,2)					
Fungos dematiáceos	4 (5,0)	4 (5,0)	17 (21,2	11 (13.7	3 (3,7)	2 (2,5)	5 6,2)	4 (5,0)	1 (1,2)	5 (6,2)

Tabela 4. Ocorrência de fungos na casca do café, da árvore à tulha (2ª colheita).

Fungos	Arvore n (%)	Pano n (%)	Varreção n (%)	Bóia n (%)	Lavador N (%)	Terreiro (1 dia) n (%)	Terreiro (2dias) n (%)	Terreiro (3 dias) n (%)	Terreiro (4 dias) n (%)	Tulha (30 dias) n (%)
Alternaria alternata	3 (3,7)	16 (20,0)			1 (1,2)	3 (3,7)	8 (10,0)	5 (6,2)	4 (5,0)	
Aspergillus niger	-						1 (1,2)			4 (10,0)
Chaetomium sp			1 (1,2)							
Cladosporium Sphaerospermum			14 (17,5)		2 (2,5)					
Cladosporium sp	17 (21,2)	3 (3,7)		43 (53.7	2 (2,5)	6 (7,5)	7 (8,7)	10 (12,5)	7 (8,7)	
Cytosporella sp		3 (3,7)								
Cyclothyrium sp	13 (16,2)	16 (20)								
Epicoccum nigrum										
Eurotium sp					2 (2,5)					
Fusarium sp	7 (8,7)	1 (1,2)		7 (8,7)						
Fusarium incarnatum	1 (1,2)	3 (3,7)	1 (1,2)	13 (16,2		2 (2,5)			2 (2,5)	1 (1,2)
Mucor racemosus								1 (1,2)		
Mucor sp	1 (1,2)	1 (1,2)								
Neurospora sp		8 (10)								
Penicillium brevicompactum										1 (1,2)
Phoma exigua	2 (2,5)									
Phoma sorghina	9 (11,2)									
Trichoderma harzianum					12 (15)					
Trichoderma sp					1 (1,2)					
Fungos dematiáceos	18 (22,5)	7 (8,7)	48 (60)	32 (40)	1 (1,2)	13 (16,2)	9 (11,2)	11 (13,7)	13 (16,2)	20 (25)

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S.; GOTT, K.P. & BACKHOUSE, D. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. SYDNEY: University of Sydney and Royal Botanic Gardens, 1994, 133p.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J.R.; SOUZA, S.M.C. **Informe Agropecuário, 18:** 5-20, 1997.

DAVIS, N.D.; DIENER, U.L.& ELDRIDGE, D.W. Production of aflatoxins B_1 and G_1 by *Aspergillus flavus* in semisynthetic medium. **Appl. Microbiol., 14:** 378-380, 1966.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W. & ANDERSON, T.H. Compendium of Soil Fungi. ECHING: IHW-Verlag, 1993, 859p.

HEENAN, C.N.; SHAW, K.J. & PITT, J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection

using coconut cream agar. **J. Food Mycol., 1:** 67-72, 1998.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs. SYDNEY: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988, 115p.

EVI, C.P.; TRENK, H.L. & MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **J. A.O.A.C., 57:** 866-870, 1974.

MICCO, C.; GROSSI, M., MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study on the contamination by ochratoxin A in green and roasted coffee beans. **ASIC, 12° Colloque,** p. 392-396, 1987.

PITT, J.I. *Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. **Appl. Environm. Microbiol., 53:** 266-269, 1987.

PITT, J.I. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. SYDNEY: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1991, 187p.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. London: Blackie Academic & Professional, 1997, 593p.

PITT, J.I. & SAMSON, R.A. Species names in current use in the *Trichocomaceae* (Fungi, Eurotiales). In: Greuter, W. ed. "Names in current use in the families *Trichocomaceae, Cladoniaceae, Pinaceae* and *Lemnaceae, regnum Veggetabile* **128: 13-57,** Konigstein Germany: Koeltz Scientific Books, 1993.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. & FILTENBORG, O. Introduction to Food-Borne Fungi. BAARN: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1996, 322p.

SCOTT, P.M.; LAWRENCE, J.W. & van WALBEEK, W. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. **Appl. Microbiol., 20:** 839-842, 1970.

STUDER-ROHR, I. *et al.* The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Fd. Chem. Toxic., 33:** 341-355, 1995.

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO CAFÉ TORRADO E MOÍDO NO ESTADO DE SÃO PAULO

Mori, E. E. M.; Anjos, V. D. A .; Bragagnolo, N.

Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL Av. Brasil 2880 , C. Postal: 139
CEP: 13073-001-Campinas-SP

INTRODUÇÃO

O mercado interno de café é o segundo maior do mundo e tem apresentado um consumo crescente os últimos cinco anos.

Em 1997, o consumo doméstico de café alcançou o patamar de 11,5 milhões de sacas conforme **SAES et al.(1997)** distribuídos em torrado e moído(88%), solúvel(12%) e expresso(5%).

Verifica-se entretanto que o café consumido no mercado interno não apresenta qualidade satisfatória e que muitos fatores contribuem para isso, principalmente a oferta de cafés de piores qualidades para as indústrias de torrefação. O conceito de qualidade do café está diretamente associado ao paladar do consumidor.

Os fatores que influenciam as características de qualidade da bebida do café são: local de origem (latitude, altitude, microclima...), espécie botânica(Arábica, Robusta), estágio e uniformidade de maturação dos grãos, métodos de colheita, processamento, armazenamento, torração, moagem, embalagem do café torrado e moído e preparo da bebida. As variações de torração alteram a percepção do sabor, do "aftertaste", da acidez e do corpo. A manutenção do ponto de torra é crítica para avaliação comparativa.

Por meio da análise sensorial o torrefador pode determinar qual é a característica do café que mais agrada o consumidor.

A análise sensorial permite avaliar através das sensações de olfação, gustação e sensação na boca as características de aroma, gosto e corpo da bebida do café

A análise sensorial da bebida do café é uma ferramenta que permite produzir "blends" homogêneos com características consistentes de sabor. "Blend" é o grande segredo industrial até porque os consumidores são fiéis ao sabor de determinada marca. Quando o sabor de um "blend"

varia, a análise sensorial pode ser utilizada para ajustar as suas características de sabor.

Avaliar a qualidade do café torrado e moído visando a melhoria dos processos industriais, desde a seleção das matérias-primas à correta escolha dos equipamentos e padrões de industrialização é o objetivo do projeto que vem sendo desenvolvido entre o Sindicato da Indústria de Café do Estado de São Paulo e o Instituto de Tecnologia de Alimentos sediado em Campinas-SP (**ABIC, 1998**).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cerca de 100 amostras de café torrado e/ou moído de indústrias paulistas e algumas de outros estados, foram analisadas quanto a umidade, granulometria, cor e análise sensorial da bebida..

O teor de umidade foi determinado pelo método de estufa (**HELRICH, 1990**) a granulometria em agitador de peneiras utilizando-se peneiras de número 16/20/30/40/50 e fundo, a cor em espectrofotômetro Color Eye 2020 e sistema de discos AGTRON/SCAA para classificação da torração variando de torração muito escura(disco 25), escura(disco 35), moderadamente escura(disco 45), média(disco 55), média clara(disco 65), moderadamente clara(disco 75), clara(disco 85) e torração muito clara(disco 95) (**LINGLE, 1992**).

A análise sensorial foi realizada com equipe de julgadores treinados e sistema computadorizado de análise sensorial Compusense utilizando análise descritiva quantitativa para avaliação das características de fragrância, aroma, defeitos, acidez, amargor, sabor, sabor residual, corpo e qualidade global, por meio de uma escala linear não estruturada de 10 cm, conforme apresentada na Figura1. (**HOWELL, 1998**).

ANÁLISE SENSORIAL DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

1. Fragrância do pó

indesejável desejável

2. Aroma da bebida

indesejável desejável

3. Defeitos da bebida

nenhum intenso

4. Acidez da bebida

baixa alta

5. Amargor da bebida

baixa alta

6. Sabor da bebida

indesejável desejável

7. Sabor Residual da bebida

indesejável desejável

8. Corpo da bebida

baixa alta

9.Qualidade Global

muito ruim excelente

Figura 1 – Ficha de Avaliação Sensorial

Foi apresentado aos provadores a definição dos termos presentes na ficha de avaliação do café conforme descrito a seguir:

FRAGRÂNCIA: é a percepção olfativa do pó de café torrado e moído. A intensidade da fragrância revela o frescor da amostra.

AROMA: é a percepção olfativa da bebida do café inalando os vapores que exalam da bebida ainda quente e, por via retronasal durante sua degustação. Para o café de torração clara, o aroma pode lembrar ao odor de nozes, amêndoas, castanhas frescas e cereal, malte, pão torrado. Para o café de torração média clara pode lembrar ao odor de caramelo, para o café de torração média pode lembrar ao odor de chocolate. Para o café de torração escura pode lembrar ao odor de resina, remédio, especiarias, queimado e cinzas.

DEFEITOS: odor e sabor de terra, mofo, batata crua, rançoso, borracha, tabaco, queimado, madeira, azedo (vinagre), fermentado, conferidos pelos grãos defeituosos como ardido, preto, verde e impurezas como terra, areia, paus e cascas. Café de excelente qualidade é aquele isento de defeitos.

ACIDEZ: propriedade sensorial de substâncias como ácidos clorogênico, cítrico, málico e tartárico que produzem gosto ácido percebido nos lados posteriores da língua. É característico de café arábica particularmente de variedades cultivadas em altitude alta. Quando é natural e desejável é chamado de ácido e quando natural e indesejável é chamado de azedo.

AMARGOR: propriedade sensorial de substâncias como cafeína, trigonelina, ácidos cafeico e quínico e outros compostos fenólicos que produzem o gosto amargo percebido no fundo da língua. Este gosto no café é considerado desejável até certo ponto. É afetado pelo grau de torração e pelo método de preparo da bebida. Quanto mais escuro, mais amargo é o café. Quanto mais fino o pó e portanto, demorado o processo de extração mais acentuado o amargor.

SABOR: é a combinação das sensações de gosto doce, salgado, amargo e ácido com os aromas de chocolate, caramelo ou cereal torrado formando o sabor característico desejável. Quando apresenta sabores estranhos lembrando a sabor de terra, herbáceo, especiaria, queimado, resina, rançoso, madeira etc é considerado indesejável.

SABOR RESIDUAL: é a sensação de gosto percebida após a ingestão da bebida. O sabor residual é desejável quando deixa um sabor que lembra ao chocolate e indesejável quando lembra ao cigarro, produto queimado, resina, químico (remédio), madeira ou outro sabor estranho.

CORPO: é a sensação tátil de oleosidade e de viscosidade na boca. Encorpado é característico de bebida forte e concentrada, produzindo uma sensação agradável na boca.

ADSTRINGÊNCIA: é a sensação deixada na boca criando uma sensação de secura que é indesejável no café.

RESULTADOS

O teor de umidade variou de 0,34% a 3,96% ficando distribuído conforme ilustrado na Figura 2 com valores bem abaixo do limite máximo de 5% permitido pela legislação.

A cor que define o ponto de torração variou de "escura" a "moderadamente clara" conforme ilustrado na Figura 3 classificando 2% das amostras no disco 35(escura), 34% no disco 45(moderadamente escura), 44% no disco 55(média), 15% no disco 65(média clara) e 5% no disco 75(moderadamente clara) .

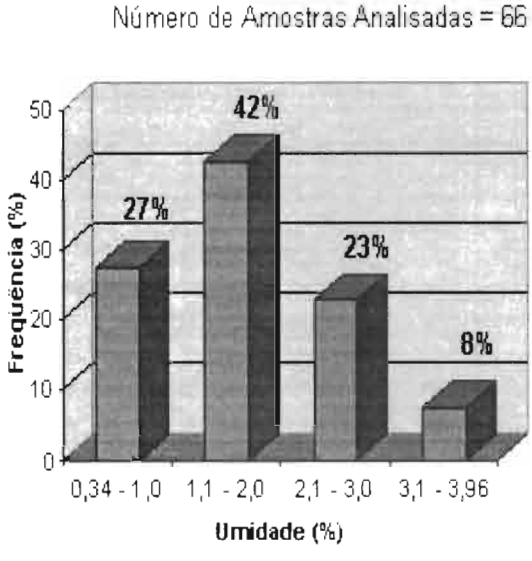


Figura 2. Variação do teor de umidade do café torrado e moído

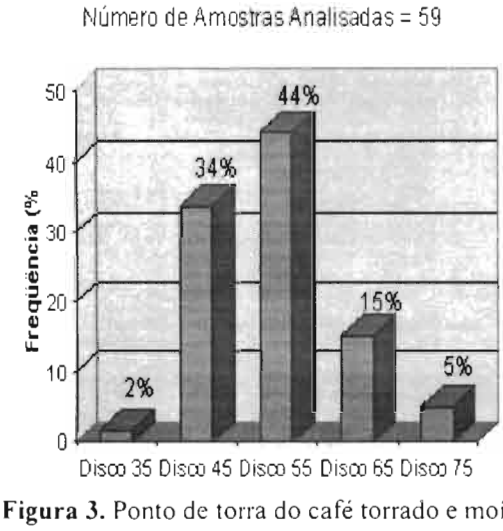


Figura 3. Ponto de torra do café torrado e moído

A distribuição média das partículas nas peneiras número 16 foi de 6%, na 20 de 21%, na 30 de 34%, na 40 de 35%, na 50 de 3% e no fundo 1%, totalizando 90% das partículas retidas nas peneiras 20, 30 e 40 (Figura.4).

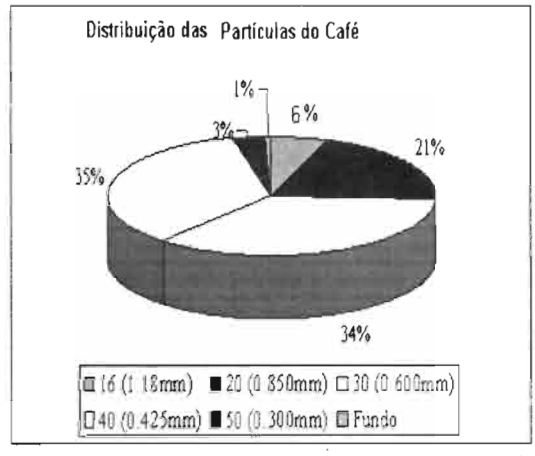


Figura 4. Distribuição das partículas nas peneiras de número 16/20/30/40/50 e fundo.

Com base nos resultados obtidos(Quadro 1) chegou-se às características que diferenciam um café de alta qualidade e de baixíssima qualidade quanto ao aspecto sensorial. O melhor café seria portanto aquele nota 10 nos atributos fragrância, aroma, sabor, sabor residual, corpo e qualidade global, livre de defeitos, acidez baixa e com amargor desejável.

A análise sensorial permitiu comparar as características do café expresso, do café orgânico e do café Tradicional (Figura 5a) mostrando que a bebida do expresso é mais encorpada, mais amarga, e com menos defeitos. O café orgânico tem fragrância, aroma, sabor e sabor residual mais desejáveis, acidez e amargor mais baixos e menos defeitos. O café tradicional ou comercial tem menor intensidade de fragrância, de aroma, é menos encorpado, sabor e sabor residual menos desejáveis e mais defeituoso que os dois anteriores. Por meio do gráfico de radar pode-se observar as diferenças entre cada tipo de bebida do café e a distribuição em qualidade para cada um dos tipos resultando em qualidade global "boa" para o café expresso e orgânico e qualidade global " média" para o café tradicional.

No estudo realizado com 104 amostras a análise sensorial classificou com qualidade global "indesejável" 1% delas , como "inferior" 3,8%, como "aceitável" 18,3%, como "média" 50%, como " boa" 22,1%, e como "superior" 4,8% das amostras analisadas.

Dentre as 89 amostras analisadas do café tradicional (Quadro 1) verificou-se que existe cafés de baixíssimas qualidade quanto as características sensoriais da bebida que apresentaram fragrância, aroma, sabor e sabor

residual indesejáveis, defeitos moderadamente intensos, acidez baixa, sem corpo, e qualidade global "indesejável" (Figura 5b) e por outro lado evidencia a existência de cafés com fragrância, aroma, sabor e sabor residual "desejáveis" com acidez moderada, sem defeitos, encorpado e com qualidade global "superior".

CONCLUSÃO

Chegou-se à conclusão de que o principal fator de o seu "blend" dentro da qualidade mínima aceitável pelo consumidor e mantê-lo padronizado. Os torrefadores concordam sobre a importância de conhecerem a matéria-prima que estão comprando, que estão recebendo, e o que estão comercializando. Hoje o Brasil caminha para analisar a matéria-prima pela sua qualidade e não pelos seus defeitos. O primeiro passo sugerido é no sentido de a indústria não utilizar cafés que tenham grãos pretos, ardidos e verdes que são defeitos que modificam as características nominais do café.

Outros aspectos importantes que influenciam na qualidade do produto, referem-se aos equipamentos e aos processos na torrefação. Cabe às indústrias pesquisarem o mercado e saberem o que há de novo em termos de equipamentos e quais as tendências.

A embalagem à vácuo deverá crescer substancialmente , apesar de hoje 90% dos cafés analisados serem embalados na tradicional "almofada".

Os dados obtidos permitem aos torrefadores conhecer a qualidade de seus cafés e a entender a importância de se ter o controle de todo o processo de industrialização.

Quadro 1 – Valores médios obtidos da análise sensorial para os cafés Expresso, Orgânico e Tradicional (número entre parênteses indicam o número de amostras analisadas de cada tipo)

	Expresso (9)			Orgânico (6)			Tradicional (89)		
Atributos Sensoriais	**Mín.**	**Méd.**	**Máx.**	**Mín.**	**Méd.**	**Máx.**	**Mín.**	**Méd.**	**Máx.**
Fragrância	6,67	**7,35**	8,02	6,80	**7,50**	7,88	3,96	**6,41**	7,66
Aroma	4,76	**6,51**	7,34	6,30	**6,59**	6,79	3,91	**5,65**	6,97
Defeitos	1,56	**2,71**	3,94	1,72	**2,23**	3,50	2,11	**3,85**	6,24
Acidez	3,60	**4,42**	5,35	1,81	**2,81**	3,77	2,12	**3,69**	6,23
Sabor	5,58	**6,55**	7,66	5,70	**6,63**	7,23	3,43	**5,40**	7,44
Sabor Residual	5,12	**5,97**	7,17	5,90	**6,30**	7,04	2,91	**5,02**	6,50
Amargor	5,51	**6,15**	6,70	3,04	**4,10**	5,26	2,68	**4,99**	6,41
Corpo	6,04	**6,66**	7,10	5,30	**5,80**	6,13	3,25	**5,40**	6,70
Qualidade Global	5,49	**6,54**	7,67	6,10	**6,73**	7,06	3,01	**5,40**	7,14

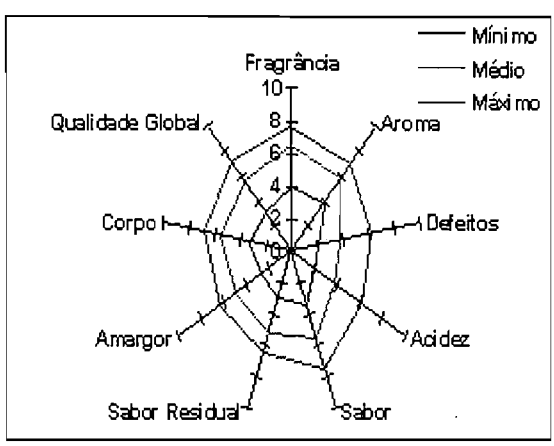


Fig. 5 A – Gráfico de radar dos cafés Espresso, Orgânico e Tradicional obtidos da análise sensorial

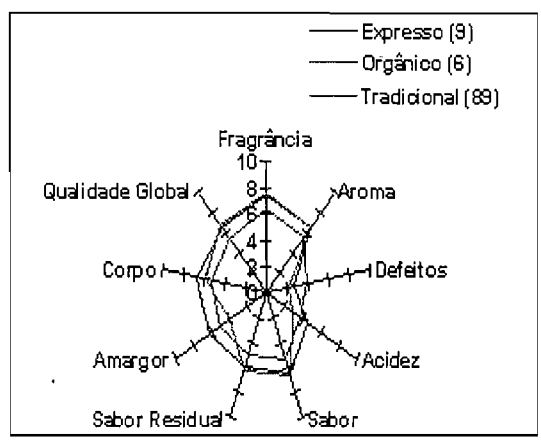


Fig. 5 B – Gráfico de radar do café Tradicional com valores míminos, médios e máximos obtidos para cada características sensorial

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC- Jornal do Café , Seminário de Qualidade do Café, p. 12-15, Ano VIII- Novembro/98- N. 87.

HELRICH, K. (ed) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists A.O.A.C. 15 (ed) Arlington, Virginia, 1990.

HOWELL, G. SCAA Cupping form & How to use it Presentation Handouts at 10 th Annual conference & Exhibition "PEAK of PERFECTION", Denver, Colorado-USA 17-21,1998.

LINGLE, T. R. The coffee cupper's handbook. Systematic Guide to the sensory evaluation of coffee's flavor. Second Edition. Specilaty Coffee Association of America, 57 p. , 1992.

SAES,M. S. M.; **JAYO**,M.; **NAKAZONE**,D.; **SILVEIRA**,R. L.F. Competitividade do sistema Agroindustrial do Café. In: Competitividade no Agrobusiness Brasileiro, Volume IV, coordenação de Farina, E. M. M. Q.; Zylbersztajn, PENSA/FIA/FEA/USP, São Paulo, 1998.

AQUISIÇÃO DA TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DE SEMENTES DE CAFEEIRO.

Delacyr da Silva Brandão Jr [1]; Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira [2]; Lilian Padilha Rubens José Guimarães [4]; José Roberto Bernardino Filho [5]; Henk Hilhorst [6].

[1]Aluno de Doutorado do Curso de Fitotecnia – UFLA; [2] Professora Titular do Departamento de Agricultura – UFLA; [3] Aluna de Doutorado do Curso de Fitotecnia – UFLA; [4] Professor Adjunto do Departamento de Agricultura – UFLA; [5]Aluno de Graduação do Curso de Agronomia – UFLA; [6]Professor de Fisiologia de Sementes - Wageningen Agricultural University – Holanda.

INTRODUÇÃO

As sementes de cafeeiro, em condições normais, mantém-se viáveis por um período relativamente curto, o que dificulta seu uso a longo prazo. Outro aspecto a ser considerado é a conservação de recursos genéticos em bancos de germoplasma, extremamente dificultada em função da baixa longevidade das sementes de cafeeiro. Esta baixa longevidade pode estar relacionada a capacidade das sementes em resistir ou não a dessecação. A literatura tem apresentado controversa em relação a este tópico. Vossen (1979) concluiu que as sementes de café podiam manter sua viabilidade quando armazenadas com 10% e 40% de umidade. King e Roberts (1979) classificaram as semente de cafeeiro como recalcitrantes, mas após cinco anos foi sugerido que estas poderiam ser ortodoxas (Roberts et al. 1984). Segundo Ellis et al. (1990), as sementes de *Coffeea arabica* podem ser classificadas em uma categoria intermediária pois a germinação não é prejudicada quando estas sementes são secas até cerca de 10% de umidade, ocorrendo o inverso quando armazenadas às temperaturas de 0° e -20°C. O estádio de desenvolvimento do fruto do cafeeiro influencia a capacidade das sementes em tolerar o processo de dessecação, sendo que sementes de cultivares do café arábica oriundas de frutos de maturidade intermediária foram hábeis para tolerar uma maior dessecação (4-5% de umidade) quando comparadas com as de frutos maduros ou verdes (Ellis et al. 1901) existe a necessidade de se conhecer mais profundamente os mecanismos envolvidos na perda da viabilidade de sementes de café. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as diferenças de tolerância à dessecação das sementes de cafeeiro provenientes de diferentes estádios de maturação. Além disto, selecionar sistemas enzimáticos que permitam verificar variações de perfis eletroforéticos nas sementes com diferentes níveis de tolerância a dessecação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de cafeeiro da cultivar catuaí vermelho foram colhidas em diferentes estádios de desemvolvimento do fruto: verde (chumbão), verde cana e cereja. Os frutos foram despolpados manualmente e a degomagem foi realizada através da fermentação em água por 24 horas a 30° C. A secagem foi efetuada em estufa de circulação forçada regulada à temperatura constante de 30°C, até as sementes atingirem teores de água em torno de 50% ("sementes úmidas") ed 15%("sementes secas"). Estas sementes foram embaladas em sacaria de polietileno e armazenadas por três meses em câmara fria a 10°C. A qualidade das sementes foi avaliada no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras-MG, através da determinação do teor de água das sementes pelo método da estufa 105°C/24h (Brasil, 1992) e dos testes de primeira contagem e contagem final da germinação, avaliação da presença de raízes secundárias e análise eletroforética de isoenzimas. O teste de germinação foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), utilizando-se porém, 4 subamostas de 50 sementes, para cada parcela experimental. O substrato utilizado foi o papel toalha do tipo "Germitest" e os rolos foram colocados em germinador mantido a 30°C. A primeira contagem foi realizada após 15 dias da instalação, e a contagem final aos 30 dias. Nesta última, foi ainda computada a percentagem de plântulas que apresentavam as raízes secundárias desenvolvidas. A atividade de isoenzimas foi avaliada pela técnica de eletroforese segundo Brune et al. (1998), onde foram utilizadas sementes inteiras para a extração das proteínas. Os géis foram revelados para as enzimas esterase (EST), álcool desidrogenase (ADH), catalase (CAT), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH) e super óxido dismutase (SOD). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial constituído por 3 níveis do fator estádio de

maturação combinados com 2 níveis do fator umidade das sementes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados contidos na tabela 1, indicam os teores de água das sementes de cafeeiro oriundas de frutos em diferentes estádios de maturação, secas para dois teores de água. Estes resultados mostram que a embalagem utilizada propiciou a manutenção de níveis de água próximos aqueles atingidos no período inicial do armazenamento.

Tabela 1: Teores de água de sementes de café oriundas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação e armazenados por três meses. Lavras, MG. 1999.

	Estádio	Teor de água inicial	Armazenamento (3meses)
	Verde	54,0	52,4
Úmidas	Verde cana	50,0	50,1
	Verm.	48,7	51,1
	Verde	15,7	16,5
Secas	Verde cana	14,4	15,7
	Verm.	13,2	13,3

Na tabela 2 estão apresentados os dados relacionados à qualidade inicial das sementes. Pode ser observado, pelos testes utilizados, que no estádio de desenvolvimento de frutos verdes, independente do teor de água, as sementes apresentaram qualidade fisiológica significativamente inferior aos das sementes oriundas de frutos no estádio verde cana e cereja. A avaliação do vigor pela presença de raízes secundárias permitiu verificar que para os frutos no estádio cereja, as sementes secas apresentaram maior vigor que nos outros estádios de desenvolvimento.

Tabela 2. Resultados médios da qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro secas e úmidas, oriundas de frutos em diferentes estádio de maturação. UFLA, Lavras, MG, 1998.

	1ª contagem (%)		Germinação (%)		Raiz Secundária (%)	
	Seca	Umida	Seca	Umida	Seca	Umida
Verm.	85,3 aA	84,9 aA	97,0 aA	96,1 aA	85,8 aA	88,5 aA
Verde cana	80,1 aA	86,2 aA	90,5 aA	92,9 aA	48,1 bB	81,7 aA
Verde	50,0 bB	67,5 bA	63,2 bA	86,3 bB	23,4 cB	50,5 bA
C. v.	5,48		9,91		10,95	

Para cada avaliação, médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pelo teste de germinação o limite de tolerância a dessecação, ou seja, intervalo no qual o processo de secagem das sementes não reduziu a qualidade das mesmas, ficou estabelecido entre os estádios de verde e verde cana do fruto. Todavia, com a secagem, foi verificada perda de vigor (% raízes secundárias) das sementes de frutos verde cana e verde. Verificou-se aumento da tolerância a dessecação com o avanço no processo de maturidade fisiológica das sementes, contradizendo Ellis et al. (1991), os quais observaram maior tolerância a dessecação em sementes oriundas de frutos com maturidade intermediária (verde cana) quando comparada com as de frutos maduros (cereja) ou imaturos (verdes). Após o armazenamento por três meses, as sementes úmidas de frutos verdes e verdes cana apresentaram qualidade inferior quando comparadas às sementes provenientes de frutos cereja (tabela 3). Por outro lado, não houveram diferenças significativas para o vigor e viabilidade das sementes de frutos cereja, armazenadas úmidas ou secas.

Tabela 3. Resultados médios da qualidade fisiológica de sementes de cafeeiro secas e úmidas, oriundas de frutos em diferentes estádio de maturação e armazenadas durante três meses. UFLA, Lavras, MG, 1998.

	1ª contagem (%)		Germinação (%)		Raiz Secundária (%)	
	Seca	Umida	Seca	Umida	Seca	Umida
Verm.	93,8 aA	91,2 aA	93,0 aA	95,7 aA	78,1 aA	68,3 aA
Verde cana	91,1 aA	76,1 bB	95,0 aA	87,2 bB	66,6 bA	39,1 bA
Verde	48,5 bA	26,8 cB	54,0 bA	37,3 cB	23,5 cA	13,1 cA
C. v.	6,07		7,65		11,31	

Para cada avaliação, médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quando se reduziu o teor de água, com exceção da percentagem de raízes secundárias, o comportamento após o armazenamento foi semelhante para as sementes de frutos no estádio cereja e verde cana. As análises eletroforéticas demonstram variações nos perfis isoenzimáticos dos sistemas EST e ADH no período inicial (figura 1). Pode ser observada nas sementes úmidas a menor atividade da EST, sendo que a medida em que se avançou no estágio de maturação das sementes, verificou-se intensificação da atividade desta enzima. Esta tendência continuou durante o armazenamento das sementes. Para a ADH, enzima relacionada ao metabolismo respiratório, a secagem propiciou o aparecimento de bandas, indicando a atividade

desta enzima nestas sementes. O armazenamento das sementes implicou em alterações do perfil de bandas da ADH, onde pôde ser observado ausência de banda presente no período anterior ao armazenamento. As enzimas MDH, GOT e SOD (dados não mostrados) das sementes armazenadas, não apresentaram alterações em seus perfis quando submetidas aos diferentes tratamentos. Por outro lado, a CAT apresentou menor atividade para as sementes armazenadas úmidas, quando comparadas às sementes secas, sendo que para as sementes oriundas de frutos verde cana, não houve o aparecimento de banda.

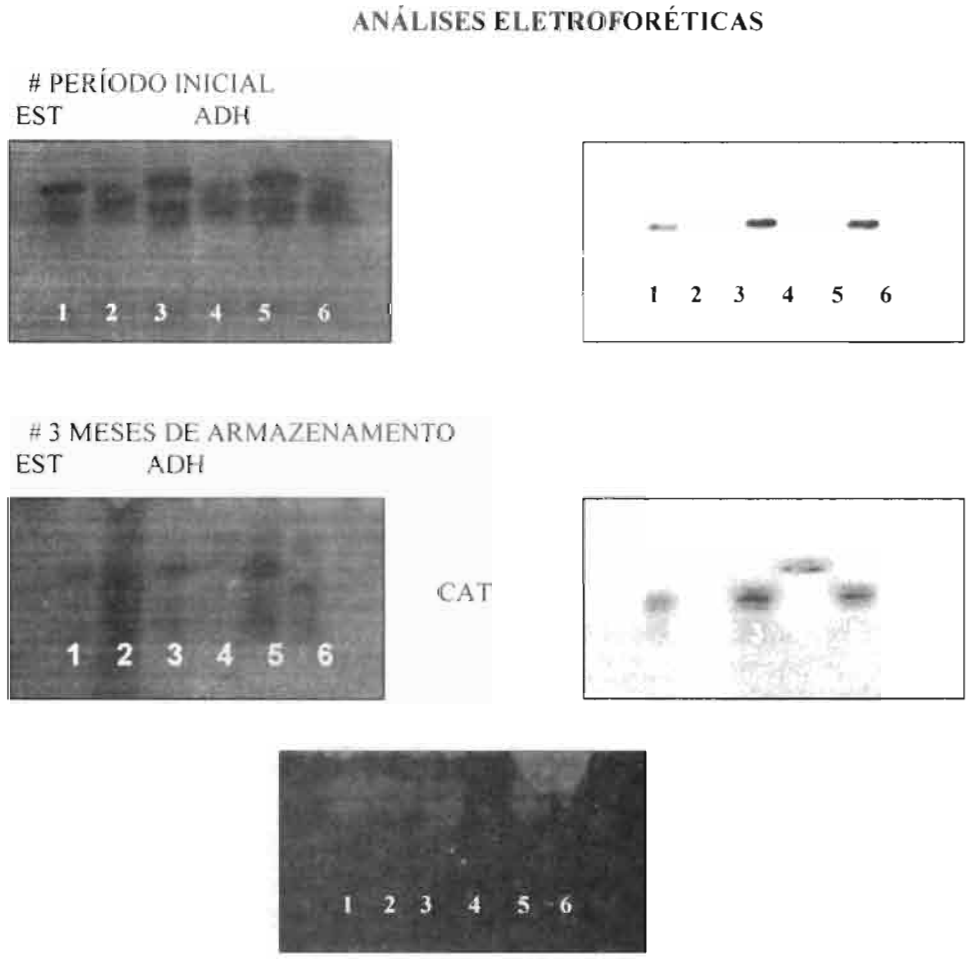


Figura 1. Padrões eletroforéticos de sementes de cafeeiro oriundas de frutos de diferentes estádio de maturação com alto e baixo grau de umidade. UFLA, Lavras, MG, 1998.

1. Semente de cafeeiro verde seca	4. Semente de cafeeiro verde cana úmida
2. Semente de cafeeiro verde úmida	5. Semente de cafeeiro cereja seca
3. Semente de cafeeiro verde cana seca	6. Semente de cafeeiro cereja úmida

CONCLUSÕES

As sementes oriundas de frutos no estádio cereja possuem maior habilidade para tolerar a dessecação quando comparada com as de frutos no estádio verde e verde cana. Os sistemas enzimáticos EST, ADH e CAT permitem verificar variações de perfis eletroforéticos nas sementes com diferentes níveis de tolerância a dessecação.

REFERÊNCIAS

Brune, W.; Alfenas, A.C. and Junghans, T.G. 1998. Identificações específicas de enzimas em géis. p.201-328 In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Ed. UFV, Viçosa.

Brasil, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária, 1992. 365p. Regras para Análise de Sementes. Brasília.

Ellis, R. H.; Hong, T. D.; Roberts, E. H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. Journal of Experimental Botany, Oxfort. Societt for Experimental Biology, 41:1167-1174.

Ellis, R. H.; Hong, T. D.; Roberts, E. H. 1991. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. Journal of Experimental Botany, Oxfort. Societt for Experimental Biology 42:653-657.

King, M. W. and Roberts, E. H., 1979. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. International Board for Plant Genetc Resources.

Vossen, H.A.M.V. 1979. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. Seed Science and Technology. 7:65-74.

EFEITO DE ADUBAÇÕES FOLIARES EM PRÉ E PÓS FLORADA NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DAS SEMENTES DE CAFEEIRO.

LIMA, Dinara Mattioli[1]., VON PINHO, Edila Vilela Resende[2]., [3]VIEIRA, Maria das Graças Guimarães Carvalho[3],. CUNHA, Rodrigo da[4]., GUIMARÃES, Rubens José[5]., MONTEIRO, João Vieira[6]

[1]Pesquisadora, bolsista DTI do CBP & D -UFLA; [2]Professor Adjunto do Departamento de Agricultura-UFLA; - [3]Professor Titular do Departamento de Agricultura-UFLA; - [4]Pesquisador da EPAMIG; - [5]Professor Adjunto do Departamento de Agricultura-UFLA - [6]Aluno de Graduação do Curso de Agronomia-UFLA - Lavras - MG.

INTRODUÇÃO

O uso de sementes de alta qualidade é um dos fatores primordiais para o sucesso da produção e, entre outros, a adubação é um dos fatores que afeta esta característica. A adubação é um dos fatores que afeta tamanho, peso e vigor das sementes, sendo que em muitas situações esses efeitos podem estar ligados à permeabilidade e integridade das membranas dos tecidos das sementes, uma vez que diversos nutrientes atuam como ativadores enzimáticos ou como componentes dessas membranas (Sá e Buzzeti, 1994).A absorção de nutrientes varia em função da espécie, das condições ambientais, bem como do estádio de desenvolvimento da planta. No cafeeiro esta absorção se intensifica nos estádios pré e pós floração (Carvajal et al., 1969).Santinato et al. (1991), avaliando os efeitos de P, Ca e B via foliar no pegamento de floradas e frutificação do cafeeiro, observaram que a aplicação de Boro e Cálcio no período de pré e pós florada promoveram maior retenção de frutos com consequente aumento da produtividade da ordem de 20 a 34%. A aplicação de Fósforo isoladamente não beneficiou a retenção de frutos e quando aplicado juntamente ao Boro, ou ao Cálcio inibiu a ação destes. Observa-se uma carência de pesquisas visando verificar as relaçõea existentes entre nutrientes fornecidos ao cafeeiro e qualidade das sementes. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de nutrientes aplicados em pré e pós florada na produção e qualidade das sementes de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi instalado em uma lavoura da cultivar Acaiá, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 15 tratamentos e 4 repetições, totalizando 60 parcelas. Cada parcela constou de 3 fileiras de 6 plantas cada, sendo avaliadas as 4 plantas centrais. Os tratamentos com 2 pulverizações, constaram de 1 aplicação foliar antes da florada principal e 1 aplicação pós florada; e os tratamentos com 1 pulverização, receberam apenas uma aplicação foliar após a florada principal.Os tratamentos foram:

1-2g bórax/planta
2-ác. bórico(0,25%)*
3-ác. bórico(0,25%) + KCl(0,1%)*
4-KCl(0,1%)*
5-ác. bórico(0,25%) + Ca Cl_2 (0,05%)*
6-ác. bórico(0,25%) + Ca Cl_2 (0,05%) + KCl(0,1%)*
7-Ca Cl_2 (0,05%)*
8-c.bórico(0,25%)+KCl(0,1%)+açúcar(0,1%) +úreia(0,1%)+sulfato de Zn(0,3%)
9-trat.8+MAP(0,1%)
10-trat.9+sulfato de Cu(0,1%)+sulfato de Mn(0,1%)+Mo(0,01%)
11-trat.10+$CaCl_2$(0,05%)*
12-açúcar(0,1%)+úreia(0,1%)+sulfato Zn(0,3%)+sulfato Mg(0,1%)+MAP(0,1%)
13-ác.bórico(0,25%)+açúcar(0,1%)+ úreia (0,1%)+sulfato de Zn (0,3%)+sulfato Mg(0,1%) + MAP(0,1%)*
14-trat.13+ Ca Cl_2 (0,05%)*
15-Testemunha sem pulverização
* Foram feitas 2 pulverizações.

A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada pelos testes de germinação(Germ), índice de velocidade de germinação(IVG), T_{50}, teste de condutividade elétrica e eletroforese de proteína total e isoenzimas. Os quais foram revelados para os sistemas: Catalase(CAT) e Esterase(EST). Para a determinação da produção, os dados foram transformados em sacos de 60 Kg de café beneficiado/ha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições do ensaio, foi verificado que a aplicação de Boro e Cálcio em pré e pós florada foi o tratamento que apresentou melhor resultado a produção em relação a testemunha.

De uma maneira geral os tratamentos que receberam as duas adubações foliares em pré e pós florada resultaram em maiores produções quando comparadas com os tratamentos que receberam apenas uma pulverização foliar em pós florada (Tabela 1). Não foi constatado efeito dos tratamentos na porcentagem de germinação das sementes, índice de velocidade de germinação, T50 e condutividade elétrica. Os marcadores bioquímicos selecionados não detectaram diferenças entre os tratamentos (Figura 1).

Fig. 1

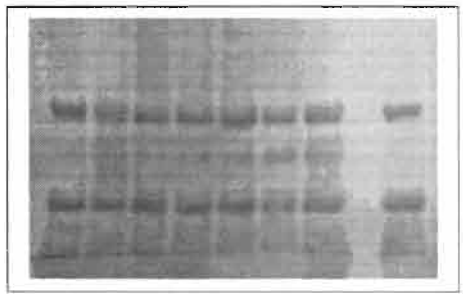


Fig 2

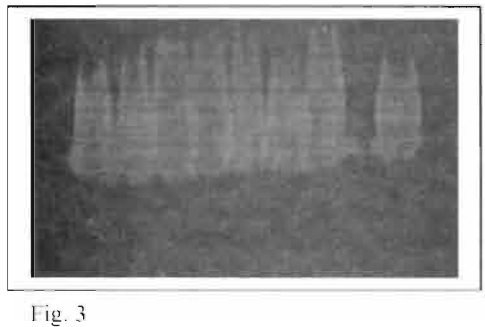


Fig. 3

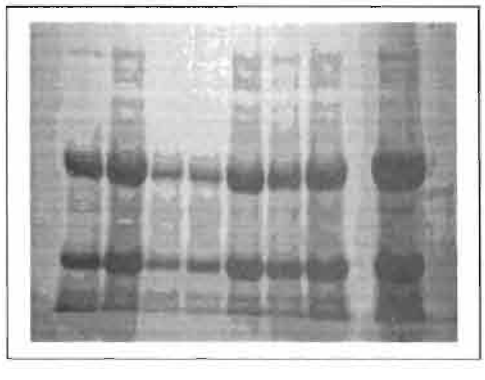


Fig.4

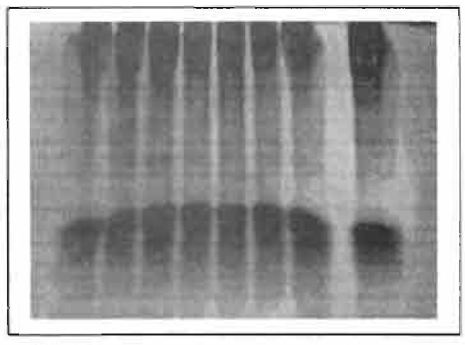


Fig. 5

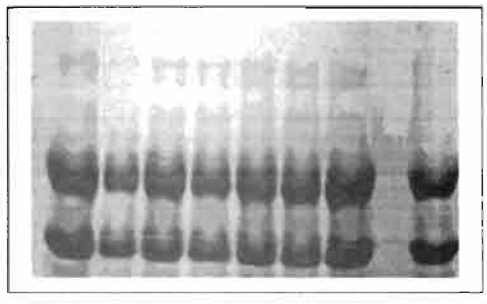


Fig 6

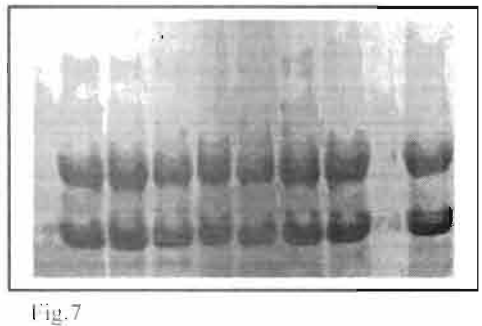


Fig.7

Fig.8

Tabela 1. Dados médios de produtividade de grãos, germinação, IVG, T_{50} e condutividade elétrica das sementes de cafeeiro da cultivar Acaiá. UFLA, Lavras-MG, 1998.

Trat.	Nº pulv.	Germ	IVG	T_{50}	Cond.	Prod.
		%	%	Dias	μmhos/cm/g	(sc/ha)
1	-	87	2,0	10,7	27,5	28,8 abc
2	2	86	2,0	11,4	30,1	26,3 abc
3	2	87	2,0	10,9	27,2	21,7 bcd
4	2	91	2,1	10,2	26,2	15,8 cd
5	2	85	2,2	10,4	25,9	39,1 a
6	2	86	2,1	10,4	26,7	25,7 abc
7	2	89	2,1	10,8	26,7	29,8 abc
8	1	79	2,0	10,6	28,0	9,2 d
9	1	85	1,9	11,1	27,3	21,4 bcd
10	1	89	2,0	10,6	26,1	18,5 bcd
11	2	90	2,1	10,6	27,2	25,6 abc
12	1	85	2,0	10,7	26,9	20,3 bcd
13	2	89	2,1	10,4	26,3	33,2 ab
14	2	90	2,0	11,0	27,9	29,5 abc
15 Test.	-	85	2,0	11,1	27,5	20,5 bcd
CV(%)	-	5,0	7,3	8,0	12,0	36,0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizada a pesquisa concluiu-se que:

- A aplicação de duas adubações foliares de Boro+Cálcio em pré e pós florada propicia maior produção;
- A adubação não influencia a qualidade fisiológica das sementes de cafeeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carvajal, J. F., Azevedo, A. and Lopez, C. A. 1969.Nutrient uptake by the coffee tree during a early cycle. Turrialba 19:13-20.

Delouche, J. C. 1980. Environmental effects on seed development and seed quality. Hort Science 15:775-780.

Sá, M. E. de.1994. Importância da Adubação na Qualidade de Sementes. p.65-98. In: Sá, M. E. de and Buzzeti, S. Importância da Adubação na Qualidade dos Produtos Agrícolas. Ícone, São Paulo.

Santinato, R, Sena, C. A., Silva, A. A. and Camargo, R. P.1991. Efeitos de P, Ca e B via foliar no pegamento de floradas e frutificação do cafeeiro. In: Congr. Bras. De Pesq. Cafeeira 17:89-91.

Szukaalski, H. 1976. Effect of fertilization with particular reference to microelements on seed quality. Soils and fertilizer 39:534.

COFFEE (*Coffea* SP.) GENETIC TRANSFORMATION FOR INSECT RESISTANCE

Magali Dufour [1], Thierry Leroy [2], Cathy Carasco-Lacombe [1], René Philippe [1] and Catherine Fenouillet [1]

[1]CIRAD-CP, B. P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France; [2]Centre de Recherches Nestlé, B. P. 9716, 37097 Tours Cedex 2, France

Running title- Coffee genetic transformation

1. INTRODUCTION

Coffee, as a woody species, has a long biological cycle and it takes between four and five years from seed to seed. Therefore, classical breeding programmes generally spread over 20 to 30 years. Unconventional breeding techniques would be of utmost importance for quick genetic progress. One of these techniques is genetic transformation. Using this process, it could be possible to insert selected traits in coffee without changing the whole genome. Genetic transformation is basically the introduction of foreign DNA into plant cells. Two main techniques are used for plant transformation: i) direct transformation, through biolistics (McCabe *et al.*, 1988), DNA uptake (Zhang and Wu, 1988), or protoplast electroporation (Fromm *et al.*, 1985), and, ii) indirect transformation using viruses or *Agrobacterium sp* (Bevan *et al.*, 1983).

Agrobacteria are natural soil-born bacteria that infect the majority of dicotyledons and a few monocotyledons. Their pathogenecity is due to the plasmid Ti-plasmid (tumour inducing) for *A. tumefaciens,* or Ri-plasmid (root inducing) for *A. rhizogenes*. Portions of the plasmid known as T-DNA are transferred into the nuclear genome of the plant. The attachment of the bacteria on the plant cells as well as the transfer itself is made possible by functions encoded by the *vir* region of the plasmid (Zupan and Zambryski, 1995). The transferred genes stably incorporate into the plant genome. The genes responsible for tumour formation can be removed (the plasmid is then called disarmed) and replaced with virtually any gene. These genes can, therefore, be transferred into plants. The efficiency of transformation is dependent on four factors:

a) Ability of *Agrobacterium* to efficiently transform cells in the target tissue (controlled by genetic and physiological factors of both the plant and *Agrobacterium*). The virulence of the *Agrobacterium* strain has to be tested first.

b) Efficient selection of all the transformed cells. Selectable and scorable (i.e. reporter) genes are needed.

c) Efficient regeneration from the transformed cells. It is the bottleneck in the process, especially for perennials. However in coffee, various regeneration pathways can be used like regeneration from protoplast, regeneration from leaf explants through organogenesis or somatic embryogenesis (Yasuda *et al.*, 1985; Zamarripa *et al.*, 1991; Berthouly and Michaux-Ferrière, 1996).

d) Stability of the incorporated DNA into the genome of the plant. In annual plants, this can be determined easily by selfing the plant in order to determine if the gene is inheritable. With perennials, Southern blot analysis must be used to identify different segments of the inserted T-DNA.

Genetic transformation was described for the first time in coffee by Barton *et al.* (1991) who worked on protoplast electroporation of *Coffea arabica*. However, no transgenic plant was regenerated from these experiments. Later on, Feng *et al.* (1992), using *C. arabica* cotyledons and somatic embryos integrated a foreign gene conferring resistance to Kanamycin (an antibiotic). Again, no plant was obtained. It was only in 1993 when transgenic plants were created by Spiral *et al.* using a co-culture of C. *canephora* somatic embryos with *Agrobacterium rhizogenes.* The regenerated plants were scored to have several DNA inserts. Unfortunately, most of these plants expressed a "hairy root" pattern. Since then, genetic transformation has been extended to other genotypes and other explant sources (Spiral and Pétiard, 1993; Sugiyama *et al.*, 1995). Leroy *et al.*, (1997) successfully used *A. tumefaciens*.

Protection against attacks by detrimental pests represents a major challenge for crop production in agriculture. This is especially true for coffee, for which a large percentage of the potential harvest yield of Brazil and East Africa is lost each year due to insects, in particular to the leaf miner (*Perileucoptera* sp.) (Guerreiro *et al.*, 1990). Since coffee is a perennial crop, it is not possible to use crop rotation as seen with annuals. Also, there are no breeding programmes using natural

sources of resistance for that insect.

Presently, control of pest development is based on application of protective agro-chemicals. For the farmers, the products are expensive and their impact is often harmful for the environment. *Bacillus thuringiensis* (*B. t.*) is an entomocidal bacterium. For more than 35 years, crystalline δ-endotoxins, which accumulate during sporulation of this bacterium, have been available as an alternative to synthetic insecticides in controlling harvest losses. The crystalline inclusions containing the endotoxins are activated in the midgut of the insects and bind to specific high affinity receptors on cell membranes. Within minutes, the midgut cells are paralysed and disrupted. *B. t.* toxins are diverse and have been found active against many insects within the order of Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. The use of *B. t.* genes to transform plants is a feasible strategy to fight insects efficiently (Estruch *et al.*, 1997; Schuler *et al.*, 1998).

Several *B.t.* endotoxins have been tested against *Perileucoptera coffeella* Guérin Méneville and one, CryIA(c), was shown as very efficient (Guerreiro *et al.*, 1993, 1998). The gene corresponding to this toxin has been isolated, cloned, artificially synthesised, and included in a vector construction containing also a selectable and a marker genes. Several transgenic coffee plants actually resistant to the leaf miner have been obtained (Leroy *et al.*, 1999,2000). Here, we describe genetic transformation of four different coffee genotypes with the *cryIA(c)* gene and the verification of the gene expression through Western blot. The accuracy of the correlation with insect bioassays is also discussed.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Plant material

Two *C. canephora* and two *C. arabica* genotypes were used (clones number 126 and 197, Catimor (8661-4), and Et29 x Ca5 F1 hybrid, respectively). They were propagated *in vitro* micro-cutting on MS-based medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 4.44 μM BAP.

2.2.Transformation protocol

LBA4404 disarmed strain of *A. tumefaciens* was used with the pBin19 plasmid (Bevan, 1984), engineered with three genes: *uidA*, coding for β-glucuronidase and containing an additional intron; the *csr1-1* gene conferring resistance to chlorsulfuron used as a selection agent; and a synthetic *cry1A(c)* gene (Sardana *et al.*, 1996), driven by the EF1α- promoter (Curie *et al.*, 1991). Leaf explants were cultured on specific semi-solid media and embryogenic cells and somatic embryos were obtained. Between 1,000 and 10,000 somatic embryos, or 10 to 50 grams embryogenic cells were used for transformation. These were soaked with bacteria ($O.D._{600nm}$: 0.3-0.5) for two hours and co-cultivated for three days in hormone-free MS medium. They were then cultivated in presence of cefotaxime (400 $mg.l^{-1}$) for 21 to 28 days, and then transferred to selective MS medium with cefotaxime (400 $mg.l^{-1}$) and chlorsulfuron (80 $\mu g.l^{-1}$). After three to six months, regeneration occurred and the somatic embryos germinated on MS medium supplemented with Morel vitamins, 1μM BAP and 0.03-M sucrose.

2.3. Rooting and hardening

Once the somatic embryos germinated and exhibited one, or two pairs of leaves, their base was sectioned with a scalpel and soaked for 12 hours in a sterile MS/2 medium containing IBA and NAA (50 $mg.l^{-1}$ each). They were then transferred to the greenhouse in peat pellets under high humidity conditions for at least three weeks. Relative humidity was then lowered progressively. Rooting occurred within a month.

2.4. Histochemical GUS assay

β- glucuronidase was assayed by overnight incubation in the classical medium (Jefferson, 1987). In order to reduce endogenous activity of non-integrated *uidA* gene, 20% v/v methanol was added. (Kosugi *et al.*, 1990).

2.5. Molecular analysis

Only the GUS positive plants were used for total DNA extraction. The protocol was described by Edwards *et al.* (1991) and modified by the addition of 100-mM sodium bisulphite. Southern blotting analysis was done as described by Leroy *et al.* (1999) and Spiral *et al.* (1999).

2.6. Bioassays

Regenerated plants of different ages were put in presence of adult Tanzania leaf miners (*Leucoptera caffeina*) for 24 hours. Two weeks later, an overall score was affected to the plant and number of pups was recorded.

2.7. Western blots

Leaves were ground in liquid nitrogen and

proteins were extracted from about one gram of fresh leaves in a standard buffer containing Tris – HCl pH8, 87% glycerol (57.5 $ml.l^{-1}$), EDTA, DTT (155 $mg.l^{-1}$), PMSF (175 $mg.l^{-1}$) and Triton $1ml.l^{-1}$. The extracts were then concentrated using Millipore Ultrafree-4® (biomax-50 membranes) filtration units (30-50 min. centrifugation at 4500 rpm) and immediately checked for protein content (Bradford, 1976). The extracts were then aliquoted and denatured (Laemmli, 1970). A 10% SDS-Page gels were used and migration of the proteins was carried out for four hours at ca. 100 V. Gels were then transferred to nitro-cellulose membranes using the Bio-Rad transblot system in Towbin buffer (Towbin *et al.*, 1979) for one hour at 100 V. Blocking occurred overnight in 0.5% non fat milk in TBS buffer supplemented with 0.1% (v/v) Tween-20. A polyclonal rabbit antiserum raised against the purified Cry1A(c) protein was used (1/2500 v/v) and detected by a goat anti-rabbit antiserum alkaline phosphatase (AP)-conjugate (Promega) at a dilution of 1/3300 (v/v).

3. RESULTS AND DISCUSSION

For the *C. canephora* genotypes, transformation efficiency was about 1%, which was approximately 1% of the explants submitted to the procedure produced embryogenic calli on selective medium. This result slightly increased in further experiments (Leroy *et al.*, 1999). Not every embryogenic callus gave rise to somatic embryo. About 30% of calli produced embryos, of which 80% germinated properly. More than 200 independent primary transformants were obtained using somatic embryos, or embryogenic calli for clone 126, and only 30 for clone 197. Three copies each of 120 primary tansformants of clone 126 were transferred to the greenhouse. The two arabica genotypes behaved differently. On selective medium, 0 to 5% of the primary Catimor explants produced directly somatic embryos, depending on the experiment. Less than 0.1% embryogenic calli appeared on the F_1 hybrid, 10% of which produced somatic embryos with a germination rate similar to that of *C. canephora*. Obviously, there was a wide genotype effect for response to the genetic transformation procedure. *C. canephora* is a diploid species in contrast with *C. arabica*, which is tetraploid. Such behaviour differences have already been noted for the aptitude to liquid medium somatic embryogenesis (Zamarripa *et al.*, 1991).

Chlorsulfuron is a herbicide and seems to be an adequate agent for selection of coffee transformed tissue. However, a certain rate of escape, up to 50% has been observed. Consequently, GUS assay was also used as a screen (Leroy *et al.*, 1999). Former experiments had shown that the antibiotic Kanamycin was not as efficient (Spiral *et al.*, 1993). Two types of analysis were carried out on the transformed plants growing in the greenhouse for at least two months. PCR and Southern blotting analysis established the presence of foreign genes. The quality of integration of the T-DNA and the number of copies integrated was documented by Southern analysis. Among 51 transformation events from *C. canephora*, the majority (69%) contained one copy of the foreign T-DNA. Up to five copies have been observed in other events (Leroy *et al.*, 1999). The presence of an expressed *cry*1A(c) gene was established by Western blotting performed on 21 independent transformation events (clone 126) (Fig. 1). Among these plants, the majority appeared rather resistant when submitted to the bioassay (Table1) with three plants being very resistant (note ≤ 1 and 0 pupa) and eight intermediate-resistant ($1<\text{note}\leq 2$ and number of pupae ≤ 2). All these plants had CryIA(c) protein activity detected by Western blotting., which confirmed the bioassay results. Five plants were susceptible; two of them were controls, two others did not have any CryIA(c) protein detected and one was Western positive. That plant was probably in a bad physiological state, which made it susceptible to the leaf miner, although the CryIA(c) protein was expressed. Also, the level of expression was perhaps low.

Besides these two categories, five plants were "intermediate-susceptible", their note being between 1.2-1.8 with a number of pupae from 3-9. Three were Western positive, but two did not have any CryIA(c) protein detected. The cryIA(c) gene was detected by PCR and Southern blot. These occurrences have already been discussed (Leroy *et al.*, 1999) and have been confirmed by recent Western blots. It could be likely that the toxin was expressed in a small amount (below 0.1% of total protein), rendering the plants somehow susceptible.

4. CONCLUSIONS

The transformation technique described here has been efficient on four different coffee genotypes although some differences have been observed in response according to genotype. A large number of plants was transferred to the greenhouse and

does not show any phenotypic aberration. Integration of T-DNA in *C. canephora* clone 126 has been confirmed by Southern blot analysis and Western blot allowed to comment gene expression. It seems that expression varied according to the bioassays, and it would be interesting to try to quantify the amount of toxin through Western blot. Bioassays are routinely carried out at the laboratory. The next step is to perform them in the field under natural conditions. This will be achieved next year, within a field study carried out in French Guyana and involving 1200 *C. canephora* clone 126 plants. The plants will be under study for five years. The purposes of this study will also include overall agronomic evaluation of the transgenic plants, including fruit production, transgenic pollen dissemination and impact of transgenic coffee on wild non-target insects.

Prospects for future studies include widening of coffee genotype array, use of other selective genes such as PMI gene (phosphate-6-mannose isomerase), and identification of genes conferring resistance to other coffee diseases or pests. Quality or fruit ripening genes could also be identified for their use in future genetic transformation programmes.

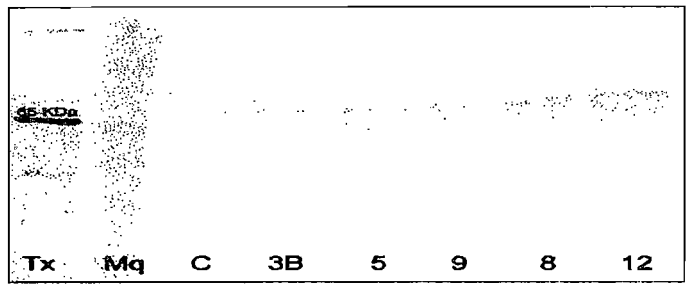
Table 1. Comparative results of Western blots and bioassays for 21 clone 126 independent transformation events

Plant number	Plant height (cm)	Bioassay note	Number of pupae	Western blot result[a]
1	17	0.9	0	+
14	37	0.9	2	+
10	26	1	0	+
20	33	1	0	+
15	29	1.1	0	+
11	24	1.1	0	+
5	47	1.1	2	+
18	48	1.2	7	+
6	35	1.4	2	+
3	23	1.5	0	+
16	35	1.6	3	+
8	29	1.7	0	+
12	33	1.7	2	+
7	34	1.8	3	+
4	45	2.5	19	+
19	48	1.2	5	-
9	50	1.6	9	-
Control A*	21	3	29	-
17	28	3	32	-
Control B*	17	3.9	11	-
2	39	3.8	29	-

[a]presence (+) or absence (-) of a band corresponding to CryIA (c) protein

*control A : non transformed plant ; control B : plant transformed with plasmid devoid of *cry* gene.

Figure 1 : Western blot membrane showing different plant profiles. C = control, non transgenic plant. Tx = purified CryIA(c) toxin



5. REFERENCES

Barton, C.R., Adams, T.L. and Zarowitz, M. A. (1991), Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. In Asic: 14ème colloque scientifique sur le café, San Francisco, pp. 460-464

Berthouly, M. and Michaux-Ferrière, N. (1996), High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora* (var. Robusta): induction conditions and histological evolution. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 44: 169-176

Bevan, M. (1984), Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acid Res., 12: 8711-8721

Bevan, M., Flavell, R. and Chilton, M.-D. (1983), A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature, 304: 184-187

Bradford, M.D. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254

Curie, C., Liboz, T., Bardet, C., Gander, E., Medale, C., Axelos, M. and Lescure, B. (1991), Cis and trans-acting elements involved in the activation of *Arabidopsis thaliana* A1 gene encoding the translation elongation factors EF-1 alpha. Nucleic Acid Res., 19: 1305-1310

Edwards, K., Johnston, C. and Thompson, C. (1991), A simple method for PCR analysis. Nucleic Acid Res., 19: 1349

Estruch J.J., Carrozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W. and Koziel, M.G. (1997), Transgenic plants : an emerging approach to pest control. Nature Biotechnol., 15: 137-141

Feng, A. V., Yang M.Z., Zheng X.S., Pan N. S. and Chen Z. L. (1992), *Agrobacterium* mediated transformation of coffee (*Coffea arabica* L.), Chinese J Biotechnol., 8 (3) : 255-260

Fromm, M., Taylor, M. and Walbot, V. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation.. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 5824-5828

Guerreiro F. O., Penna M.F., Gonçalves W. and Carvalho A. (1990), Melhoramento do cafeiiro: XLIII Selecao do cafeeiros resistentes ao bicho-miniero. Bragantia 49 (2): 291-304

Guerreiro, F. O., Denolf, P., Frutos, R., Peferoen, M. and Eskes, A. B. (1993), L'identification de toxines de *Bacillus thuringiensis* actives contre *Perileucoptera coffeella*. Asic, 15ème colloque scientifique sur le café, Montpellier, France, pp. 329-335

Guerreiro, F. O., Denolf, P., Peferoen, M., Decazy, B., Eskes, A. B. and Frutos, R. (1998), Susceptibility of the coffee leaf miner (*Perileucoptera spp*) to *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins: a model for transgenic perennial crops resistant to endocarpic insects. Current Microbiol. 36: 175-179

Jefferson, R. (1987), Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mole. Biol. Reporter 5 (4): 387-405

Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakayama, K. and Arai, Y. (1990), An improved assay for β-glucuronidase in transformed cells : methanol almost completely suppresses a

putative endogenous β-glucuronidase activity. Plant Science 70 : 133-140.

Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Leroy, T., Royer, M., Paillard, M., Berthouly, M., Spiral, J., Tessereau, S., Legavre, T. and Altosaar, I. (1997), Introduction de gènes d'intérêt agronomique dans l'espèce *Coffea canephora* Pierre par transformation avec *Agrobacterium sp.* In Asic, 17ème colloque scientifique sur le café, Nairobi,Kenya, pp. 439-446

Leroy, T., Philippe, R., Royer, M., Frutos, R., Duris, R., Dufou,r M., Jourdan, I., Lacombe, C. and Fenouillet, C. (1999), Genetically modified coffee trees for resistance to coffee leaf miner. Analysis of gene expression, resistance to insects and agronomic value. In Asic 18ème colloque scientifique sur le café, Helsinki, Finland

Leroy, T., Henry, A.-M ., Royer, M., Altosaar, I., Frutos,R., Duris, R. and Philippe, R. (2000), Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene for resistance to leaf miner. Plant Cell Reports, 19 : 382-389

McCabe, D., Swain, W., Martinelli, B. and Christou, P. (1988), Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology 6: 923-926

Murashige, T. and Skoog, F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15 : 473-497

Sardana, R., Dukiandjiev, S., Giband, M., Cheng, X.Y., Cowan, K., Sauder, C. and Altosaar, I. (1996), Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA (b&c) by expression in maize endosperm culture. Plant Cell Reports, 15 : 677-681

Schuler, T.H., Poppy, G. M., Kerry B. R. and Denholm I. (1998), Insect resistant transgenic plants. Tib Tech., 16: 168-175

Spiral, J. and Pétiard, V. (1993), Développement d'une méthode de transformation génétique appliquée à différentes espèces de caféiers et régénération de plantules transgéniques. In Asic, 15ème colloque scientifique sur le café, Montpellier, France, pp. 115-122

Spiral, J., Thierry, C., Paillard, M. and Pétiard, V. (1993), Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. C.R. Acad. Sci. Paris 316 (série III): 1-6

Spiral, J., Leroy, T., Paillard, M. and Petiard, V. (1999), Transgenic coffee (*Coffea* species). In-: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 44, Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 55-76

Sugiyama, M., Matsuoka, C. and Takagi T. (1995), Transformation of coffee with *Agrobacterium rhizogenes*. In Asic, 16ème colloque scientifique sur le café, Kyoto, Japan, pp. 853-859

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76: 4350-4354

Yasuda, T., Fujii, Y. and Yamaguchi T. (1985), Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol., 26: 595-597

Zamarripa, A., Ducos, J.P., Tessereau, H., Bollon, H., Eskes, A. and Pétiard, V. (1991), Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide : effet de la densité d'inoculation et du renouvellement du milieu. Café Cacao Thé, XXXV (4): 233-244

Zhang, W. and Wu, R. (1988), Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplast and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. Theor. Appl. Gen., 76: 835-840

Zupan, J.R. and Zambryski, P. (1995), Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047

A comissão Organizadora do III SIBAC agradece o apoio prestado pelas seguintes empresas:

1- UBY AGROQUÍMICA Ltda.

2- Hokko do Brasil Ltda.

3- Hoesht Shering AgrEvo do Brasil Ltda.

4- PREMOLTEC - Indústria de Pré-moldado Ltda.

5- URSO BRANCO - Indústria de Máquinas e Equipamentos Ltda.

6- Máquinas Agrícolas Jacto S.A.

7- Milenia Agrociência Ltda.

8- Prefeitura Municipal de Londrina: COMURB.

9- SERCOMTEL.

10- Sociedade Rural do Paraná.

Agradecimentos Especiais:

1-UNIÃO EUROPÉIA – EUROPEAN UNION (EU).

2- CIRAD – Centre de Coopération Internationale em Recherche Agronomique pour le Développement.