



**ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL**

**MICROPROPAGAÇÃO DO CAFEIRO POR  
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA VIA  
BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

**LAVRAS – MG  
2011**

**ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL**

**MICROPROPAGAÇÃO DO CAFEIEIRO POR EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA VIA BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientador

Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho

**LAVRAS – MG  
2011**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Maciel, Anna Lygia de Rezende.

Micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática via  
biorreator de imersão temporária / Anna Lygia de Rezende Maciel. –  
Lavras : UFLA, 2012.

115 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Café. 2. Propagação. 3. Melhoramento genético. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.733

**ANNA LYGIA DE REZENDE MACIEL**

**MICROPROPAGAÇÃO DO CAFEIEIRO POR EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA VIA BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 18 de novembro de 2011

Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho	EMBRAPA
Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho	EPAMIG
Dr. José Sérgio de Araújo	IFSUL de MINAS
Dr. Virgílio Anastácio da Silva	UFLA

Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2011**

*A Deus pelo dom da vida.  
A Nossa Senhora pelo conforto em todos os momentos da minha vida,  
principalmente naqueles mais difíceis.*

### **AGRADEÇO**

*Aos meus pais Nívea e Célio Henrique  
Aos meus irmãos Tulio Marcos e João Paulo  
As minhas sobrinhas Mariana, Joana e Julia  
Ao meu sobrinho e afilhado Pedro Henrique  
com todo amor.*

### **DEDICO**

*Ao Douglas pela paciência e compreensão.*

### **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo apoio incondicional.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus* Muzambinho, pela oportunidade.

À Fundação Procafé, por permitir a utilização de sua estrutura para a realização de todo o trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café – INCT Café.

Ao meu orientador Professor Moacir Pasqual pela orientação, amizade, compreensão e pelos ensinamentos transmitidos durante todas as fases da minha formação profissional.

Ao coorientador, Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, grande responsável pela realização deste trabalho, por toda atenção e ensinamentos.

Ao professor Luiz Carlos Machado Rodrigues, Diretor Geral do IF Sul de Minas – *Campus* Muzambinho, pela confiança.

Aos membros da banca examinadora, Prof. José Sérgio de Araújo, Prof. Virgílio Anastácio da Silva e Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho, pela disponibilidade e sugestões.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Fundação Procafé, em especial à pesquisadora Ana Carolina e aos bolsistas de iniciação científica Elisane, Jaqueline, Aline, Vanessa e Bruno pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos grandes amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, Vantuil, Antônio Claret e Evaldo, pelo companheirismo durante tantos anos de luta.

Ao tecnólogo em cafeicultura, Rafael Antônio, pelo auxílio durante a realização dos trabalhos.

Ao professor Rubens José Guimarães pelas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, em especial a Marli dos Santos Túlio, pela disponibilidade e simpatia sempre constante.

Enfim, a todos que direta e indiretamente participaram da realização deste trabalho e da minha formação profissional.

**MUITO OBRIGADA!!!**

*“... cada um de nós compõe a sua história,  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz,  
e ser feliz...”*

Almir Sater e Renato Teixeira

## RESUMO

O trabalho foi realizado em 2 etapas, na primeira, o objetivo foi otimizar a micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática via biorreator. Os delineamentos experimentais utilizados foram inteiramente casualizados e os materiais vegetais foram matrizes 03, 05 e 18 da população de Siriema. Experimento 1: foi instalado em esquema fatorial 2x2, constituídos por 2 meios de cultura: “T3” e “MM” e 2 tipos de calos: claros e escuros, com 6 repetições. Avaliou-se, aos 60 dias, por meio da: massa fresca final e aumento de massa dos calos, densidade final das células e porcentagem do incremento de calos. Experimento 2: foram utilizadas concentrações de ANA - ácido naftaleno acético - (0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup>) adicionadas em meio “RM”, com 6 repetições. Avaliou-se aos 60 dias o número total de embriões. Experimento 3: foram usadas 5 concentrações de Prolina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g.L<sup>-1</sup>) adicionadas em meio RR, com 5 repetições e 4 setores de 100g de calos. Avaliou-se aos 120 dias o número total de embriões. Experimento 4: os tratamentos constituíram-se dos meios de cultura: T5A, T5A 1, T5A 2, T5A3 e T5A4 com 6 repetições, sendo inoculados 500 embriões por biorreator. Após 84 dias, avaliaram-se: número de embriões germinados, % de plântulas pequenas, médias e grandes e % de plântulas pequenas, médias e grandes enraizadas. O meio de cultura “MM” apresenta a maior multiplicação de calos, ANA e prolina promovem maior número de embriões e o emprego do biorreator é eficiente no processo. O objetivo da segunda etapa foi avaliar a aclimatização de somaclones de cafeeiro oriundos de biorreator. Experimento 1: foi instalado em esquema fatorial 4X3 (4 substratos: fibra de coco; 2/3 fibra de coco+1/3 areia; plantmax e 2/3plantmax+1/3 areia e 3 tamanhos de embriões cotiledonares: pequeno, médio e grande) com 4 repetições de 25 embriões. Aos 60 dias, foi avaliada a % de conversão de embriões cotiledonares em plântulas. Experimento 2: foi instalado em esquema fatorial 4X5 (4 substratos: fibra de coco; 2/3 fibra de coco+1/3 vermiculita; plantmax e 2/3plantmax+1/3 vermiculita e Stimulate: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 ml.L<sup>-1</sup>) com 4 repetições de 25 embriões. Aos 60 dias, avaliou-se a porcentagem de conversão. Experimento 3: foi em esquema fatorial 2X5 (substratos: plantmax e 2/3plantmax + 1/3 de vermiculita e osmocote: 0,0; 2,72; 5,45; 8,18 e 10,90g.L<sup>-1</sup>), com 4 repetições e 5 plantas por parcela. As avaliações foram realizadas aos 180 dias por meio: altura de plantas, diâmetro de caule, número de pares de folhas, área foliar, matéria fresca e seca de raízes e parte aérea e teores de nutrientes nas folhas. O maior percentual de conversão é obtido com plântulas médias em plantmax, o substrato composto por plantmax e vermiculita apresenta maior porcentagem de conversão em concentrações crescentes de

stimulate e o osmocote na concentração de  $10,9\text{g.L}^{-1}$  proporciona maior desenvolvimento das mudas.

Palavras-chave: Biotecnologia. *Coffea arabica* L. Propagação.

## ABSTRACT

The first goal of the work was to optimize the micropropagation by somatic embryogenesis of coffee through temporary immersion bioreactor. The experiments were conducted at the Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, Varginha/MG. The experimental design used was completely randomized. The plant materials were clones 03, 05 and 18 of cv. Siriema (*Coffea arabica* x *Coffea racemosa*). Experiment 1: It was installed in a 2x2 factorial design, consisting of two media: "T3" and "MM" and two types of calli: light and dark, with six repetitions. Was evaluated at 60 days, through: the fresh weight and weight gain of callus, the final density of cells and the percentage of increase of calli. Experiment 2: The treatments consisted of five concentrations of NAA (0.00, 0.25, 0.50, 1.00 and 2.00 mg.L<sup>-1</sup>) with 6 repetitions. The evaluations were conducted after 60 days by the total number of embryos. Experiment 3: Used five concentrations of proline (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 g.L<sup>-1</sup>) with 5 replications and 4 sectors of 100g of callus per plot. Was evaluated at 120 days the total number of globular embryos. Experiment 4: The treatments consisted of media: T5A, T5A 1, 2 T5A, T5A3 and T5A4 with 6 replicates and ± 500 embryos inoculated per bioreactor. Evaluations were performed at 84 days, to evaluate: the number of embryos germinated, % small, medium and large plantlets and % small, medium and large plantlets with roots. The culture medium "MM" has the highest proliferation of bioreactor. Experiment 1: It was installed in 4X3 factorial design (four substrates and three sizes of plantlets) with four replicates of 25 plantlets. At 60 days, the experiment was evaluated by the % of fixation of plantlets. Experiment 2: The experiment was conducted in a factorial 4x5 (4 substrates and 5 Stimulate® concentration) with four replicates of 25 plantlets. At 60 days, we evaluated the percentage of fixation of plantlets. Experiment 3: The experiment was a factorial 2X5 (2 substrates and 5 Osmocote® concentrations). Evaluations were performed at 180 days by plant height, stem diameter, number of leaves, leaf area, fresh and dry matter of roots and shoots and leaf nutrient levels. The highest percentage plantlets set is obtained using medium plantlets in Plantmax. The substrate composed of vermiculite and Plantmax higher percentage of plantlets set in increasing concentrations of Osmocote® between 450 - 600g.55L substrate<sup>-1</sup> and Stimulate® provides better seedling quality.

Keywords: Biotechnology. *Coffea arabica* L. Propagation.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 Biorreator de imersão temporária ‘ RITA’ ..... 35

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Número de embriões obtidos em meio “RM” de regeneração sob diferentes concentrações de ANA ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 ..... 63
- Figura 2 Número de embriões globulares obtidos em meio “RM” sob diferentes concentrações de Prolina ( $\text{g.L}^{-1}$ ). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011..... 64
- Figura 3 Micropropagação do cafeeiro por biorreator de imersão temporária tipo “RITA®”. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 ..... 67

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 Porcentagem de pegamento de embriões cotiledonares em diferentes substratos e concentrações do fitorregulador stimulate®. UFLA, Lavras, MG, 2011. .... 87
- Figura 2 Número de folhas verdadeiras em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. .... 89
- Figura 3 Altura de plantas (cm) de cafeeiro cultivados em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011..... 90

Figura 4	Área foliar (cm <sup>2</sup> ) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011.....	91
Figura 5	Diâmetro de caule (mm) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	93
Figura 6	Diâmetro de caule (mm) de plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011. ....	93
Figura 7	Massa fresca da parte aérea (MFPA) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	95
Figura 8	Massa seca da parte aérea (MFPA) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011.....	96
Figura 9	Massa seca da parte aérea (MFPA) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011. ....	97
Figura 10	Massa fresca do sistema radicular (MFSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	97
Figura 11	Massa fresca do sistema radicular (MFSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011. ....	98
Figura 12	Massa seca do sistema radicular (MFSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	98

Figura 13	Massa seca do sistema radicular (MSSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011. ....	99
Figura 14	Teores foliares de nitrogênio em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	101
Figura 15	Teores foliares de fósforo em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	102
Figura 16	Teores foliares de cálcio em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	103
Figura 17	Teores foliares de nitrogênio em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	104
Figura 18	Teores foliares de enxofre em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta Osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	105
Figura 19	Teores foliares de boro em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	106
Figura 20	Teores foliares de cobre em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta Osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	107
Figura 21	Teores foliares de zinco em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011. ....	109

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Componentes dos meios de culturas utilizados durante as etapas a embriogênese somática em <i>C. arabica</i> L. UFLA, Lavras-MG, 2011 .....	53
Tabela 2	Análise de variância para as características massa fresca final de calos embriogênicos (MFFCE), aumento da massa de calos embriogênicos (APCE), densidade final das células (DFC) e porcentagem do incremento de calos embriogênicos (%I). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 .....	59
Tabela 3	Média dos valores da massa fresca final de calos embriogênicos (MFFCA), do aumento do peso dos calos embriogênicos (APCE), da densidade final das células (DFC) e da porcentagem do incremento de calos embriogênicos (I%) em diferentes meios de cultura. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 .....	61
Tabela 4	Análise de variância para a característica número de embriões. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 .....	62
Tabela 5	Análise de variância para a característica número de embriões. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 .....	64
Tabela 6	Análise de variância para as características número de embriões cotiledonares (NEC), % de embriões cotiledonares pequenos (%ECP), médios (%ECM) e grandes (%ECG), % de embriões cotiledonares pequenos com raízes (%ECPR), médios com raízes (%ECMR) e grandes com raízes (%ECGR). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011 .....	65

Tabela 7	Valores médios para as características número de embriões cotiledonares (NEC), % de embriões cotiledonares pequenos (%PP), % de embriões cotiledonares médios (%PM), % de embriões cotiledonares grandes (%PG), % de embriões cotiledonares pequenos com raízes (%PPR), % de embriões cotiledonares médios com raízes (%PMR) e % de embriões cotiledonares grandes com raízes (%PGR) em deferentes meios de cultura. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011.....	68
----------	--	----

### **CAPÍTULO 3**

Tabela 1	Análise de variância para a característica porcentagem de conversão de embriões cotiledonares em plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2011 .....	85
Tabela 2	Conversão de embriões cotiledonares em plântulas (%) de cafeeiros de diferentes tamanhos em substratos distintos. UFLA, Lavras, MG, 2011 .....	86
Tabela 3	Análise de variância para a característica porcentagem de pegamento. UFLA, Lavras, MG, 2011.....	87
Tabela 4	Análise de variância para as características: número de folhas verdadeiras (NFV), altura de plantas (cm), área foliar (AF, cm <sup>2</sup> ) e diâmetro de caule (DC, mm). Muzambinho, MG, 2011 ....	88
Tabela 5	Análise de variância para as características massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR) e massa seca do sistema radicular (MSSR). Muzambinho, MG. 2001.....	94

Tabela 6	Análise de variância para as características teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). Muzambinho, MG, 2011 .....	100
Tabela 7	Análise de variância para as características teores de boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn). Muzambinho, MG, 2011. ....	105

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução geral .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	23
2.1 <i>Coffea arabica</i> L .....	23
2.2 Multiplicação clonal .....	24
2.3 Embriogênese somática .....	26
2.4 Biorreatores.....	31
2.5 Aclimatização .....	37
CAPÍTULO 2 Micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática em biorreator de imersão temporária.....	47
1 INTRODUÇÃO .....	50
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
2.1 Caracterização geral dos experimentos.....	53
2.2 Material vegetal .....	54
2.3 Experimento 1: multiplicação de calos embriogênicos.....	54
2.4 Experimento 2: ácido naftaleno acético na regeneração de embriões globulares.....	56
2.5 Experimento 3: prolina na regeneração de embriões .....	56
2.6 Experimento 4: BAP e AIA na maturação de embriões em biorreator tipo Rita®.....	57
2.7 Análise estatística .....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
3.1 Experimento 1: multiplicação de calos embriogênicos.....	59
3.2 Experimento 2: ácido naftaleno acético na regeneração de embriões globulares.....	62

3.3 Experimento 3: prolina na regeneração de embriões globulares .....	63
3.4 Experimento 4: BAP e AIA na maturação de embriões em biorreator tipo Rita®.....	65
4 CONCLUSÕES .....	70
CAPÍTULO 3 Acclimatização de somaclones de cafeeiro obtidos em biorreator de imersão temporária tipo Rita®.....	74
1 INTRODUÇÃO .....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	80
2.1 Acclimatização .....	80
2.1.1 Caracterização geral dos experimentos.....	80
2.1.2 Material vegetal .....	80
2.1.3 Experimento 1: substratos e tamanho dos embriões cotiledonares.....	81
2.1.4 Experimento 2: substratos e fitorregulador stimulate® .....	81
2.1.5 Avaliações e análises estatísticas.....	82
2.2 Experimento 3: crescimento de plântulas em diferentes substratos e concentrações de fertilizante de liberação lenta.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1 Acclimatização .....	85
3.1.1 Experimento 1: substratos e tamanho dos embriões cotiledonares.....	85
3.1.2 Experimento 2: substratos e fitorregulador stimulate® .....	86
3.2 Experimento 3: crescimento de mudas em diferentes substratos e concentrações de fertilizante de liberação lenta.....	88
4 CONCLUSÕES .....	110

## **CAPÍTULO 1 Introdução geral**



## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e o segundo maior consumidor mundial de café. A cafeicultura também proporciona milhões de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia produtiva, exercendo importante papel social no campo.

A safra de café do Brasil em 2011/12 foi estimada em 43,15 milhões de sacas de 60 kg pela Companhia Nacional de Abastecimento (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2011), que divulgou o levantamento para a commodity na temporada. O centro-sul é a principal região cafeeira do país e os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná somam mais de 90% da produção nacional.

Neste contexto, o amplo desenvolvimento científico e tecnológico do agronegócio café vem assegurando alta produtividade e lucratividade. O melhoramento genético do cafeeiro tem contribuído de maneira decisiva para este desenvolvimento, incorporando, por meio de cruzamentos, ganhos genéticos para produtividade e outras características de interesse agrônomo.

No entanto, no que se refere ao material genético, o uso de cultivares geneticamente estáveis, embora tenha contribuído significativamente para se atingir elevada produtividade, limita as possibilidades de exploração da variabilidade genética existente, sobretudo em relação ao potencial representado pela heterozigose em plantas híbridas (TEIXEIRA et al., 2004).

A exploração da heterozigose depende da disponibilidade de uma metodologia de propagação vegetativa que permita a seleção de material precoce, em larga escala e em curto espaço de tempo, sendo uma técnica importante para as culturas de ciclo longo.

A embriogênese somática em *Coffea* é um importante método de multiplicação de plantas elite *in vitro*, em larga escala, apresentando um grande

potencial a ser explorado, capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio, como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática via biorreator de imersão temporária.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Coffea arabica* L

Dentro do gênero *Coffea* existem duas espécies comercialmente importantes: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. Cerca de 70% dos plantios comerciais mundiais são do tipo arábica, principalmente pela qualidade superior de sua bebida (MATIELLO et al., 2005).

O cafeeiro arábica se reproduz preponderantemente por autofecundação e comercialmente é propagado por sementes, as estratégias de melhoramento genético visam ao desenvolvimento de cultivares altamente homozigotas para que, por sementes, sejam instaladas lavouras uniformes (MEDINA FILHO; BORDIGNON; CARVALHO, 2008).

Os trabalhos de melhoramento genético do cafeeiro tiveram início no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na década de 1930. Com os trabalhos de melhoramento no Brasil, executados até os dias atuais, foram obtidos ganhos consideráveis em produtividade, possibilitando um aumento de produção de 295% em relação a cultivar Típica. Atualmente, existem mais de 105 cultivares registrados no Registro Nacional de Cultivares (RNC) de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre adaptadas para diferentes condições ambientais (CARVALHO, 2008).

A cultivar Siriema, utilizada neste estudo, foi originada de um cruzamento natural entre *Coffea racemosa* e *C. arabica* cv. Blue Mountain. Posteriormente, no IAC, ocorreram dois retrocruzamentos naturais com *C. arabica* e a planta selecionada recebeu sigla IAC 1195-5-6-2. As sementes dessa introdução foram plantadas em Caratinga – MG, onde foi selecionada a planta C1195-5-6-2-119, com elevada resistência à ferrugem. A planta C1195-5-6-2-119 foi, então, cruzada com o Catimor UFV 417 com o objetivo de incorporar

também a resistência ao bicho-mineiro. Desse cruzamento, a planta 842, com resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem, foi selecionada (CARVALHO, 2008).

As progênies da cultivar Siriema, apresentam, em geral, folhas ligeiramente coriáceas, mais espessas que as folhas de “Catuaí” e de coloração verde-escura quando atingem a fase de maturação. As plantas possuem porte baixo a médio e os frutos podem ser vermelhos ou amarelos, dependendo da progênie. É moderadamente resistente à ferrugem, e ao bicho-mineiro, cuja resistência é proveniente do *Coffea racemosa*. Embora o mecanismo de resistência ao bicho-mineiro ainda não esteja determinado, acredita-se que suas folhas produzam alguma substância tóxica ou deixem de produzir alguma substância essencial à praga (CARVALHO, 2008).

Contudo, a cultivar Siriema está em desenvolvimento, a produtividade média ainda não é considerada satisfatória e ainda não foi possível fixar a resistência ao bicho-mineiro. Cerca de 30 a 40% das plantas obtidas por meio de sementes são atacadas pelo inseto. No entanto, a “Siriema” ainda não está disponível para plantio. Com o objetivo de acelerar a liberação comercial da “Siriema”, foram selecionadas plantas matrizes com resistência ao bicho-mineiro, resistência à ferrugem, alta produtividade e boa qualidade de sementes para multiplicação vegetativa em larga escala, via cultura de tecidos vegetais. Plantas de “Siriema” que foram produzidas por esse processo estão atualmente sendo avaliadas no campo (CARVALHO, 2008).

## **2.2 Multiplicação clonal**

O desenvolvimento de uma cultivar de cafeeiro é um processo longo, que pode consumir até 30 anos de trabalho. Esse fato ocorre devido ao processo de melhoramento genético requerer um ou mais cruzamentos e vários ciclos de seleção, a fim de que as características de interesse sejam reunidas e fixadas na

nova cultivar, permitindo a produção de plantas uniformes por meio de sementes. Todas as cultivares de café arábica desenvolvidas no Brasil foram obtidas por esse processo. Outra forma para o desenvolvimento de cultivares de cafeeiro é pela seleção de plantas matrizes e a sua posterior multiplicação por propagação vegetativa. Nesse método, a seleção das plantas com as características de interesse pode ser realizada em um menor espaço de tempo, cerca de 8 a 10 anos. A propagação vegetativa produz clones de planta matriz, possibilitando a multiplicação de híbridos e de plantas superiores que ainda segregam para uma ou mais características (CAIXETA et al., 2008).

A multiplicação vegetativa tem potencial para ocupar um papel de destaque no melhoramento genético do cafeeiro no transcurso dos próximos anos. Todavia, como consequência do dimorfismo vegetativo próprio da espécie *C. arabica*, a multiplicação assexuada pelos métodos convencionais restringe a utilização de fragmentos de ramos ortotrópicos, onde o número é sempre limitado para um clone novamente selecionado. Os métodos *in vitro* oferecem o potencial de se obter altas taxas de multiplicação a partir de segmentos de tecidos muito pequenos e de conseguir um grande número de indivíduos isentos de microrganismos, em espaços bastante reduzidos (DUBLIN, 1984).

A cultura de tecidos utiliza-se de técnicas por meio das quais pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, designados explantes, são retirados de plantas de genótipos interessantes e cultivados em meio nutritivo, em condições assépticas. Os fragmentos podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, de onde se originam calos que, pelo uso de reguladores de crescimento adicionados ao meio, podem se diferenciar em raízes, brotos e, enfim, produzir uma planta inteira *in vitro*. É considerada uma técnica de relevada importância, pois permite a propagação rápida, de culturas de ciclo longo, como *C. arabica*. Visa obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser: meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Baseia-

se na totipotencialidade celular, ou seja, na capacidade de uma célula regenerar um organismo idêntico àquele que a originou, visto que possui toda a informação genética necessária para isso (PEREIRA et al., 2007).

Os trabalhos pioneiros com café, em cultura de tecidos, foram publicados por Staritsky (1970) que teve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *C. canephora*. Depois, muitos trabalhos foram realizados em diferentes países usando métodos e espécies diversos.

São várias as metodologias de cultura de tecidos empregadas nos programas de melhoramento do café, tais como a micropropagação, cujo objetivo é realizar a rápida multiplicação do material melhorado, a manutenção de bancos de germoplasma e a multiplicação de híbridos interespecíficos; cultura de embriões, para a recuperação de embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos e para a antecipação da época de plantio; cultura de meristemas, para obtenção de plantas livres de vírus; embriogênese somática, por intermédio de explantes foliares para obtenção da planta inteira e cultura de anteras para a obtenção de plantas homozigotas (ANDRADE, 1998).

### **2.3 Embriogênese somática**

Um importante método de multiplicação *in vitro* de plantas de *Coffea* é a embriogênese somática, que consiste no desenvolvimento de embrioides a partir de células haploides ou somáticas diploides, sem que haja a fusão de gametas, e que possibilita micropropagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos (PEREIRA et al., 2007).

A embriogênese somática, em nível experimental, é uma tecnologia que já foi testada com sucesso para a multiplicação de híbridos F1 em alguns países da América Central e no Brasil. Plantas obtidas por esse processo apresentam

comportamento semelhante ao de plantas oriundas de sementes, não havendo limitações para a sua utilização comercial (CARVALHO et al., 2011; DUCOS et al., 2008; ETIENNE; BERTRAND, 2001).

A embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões (SHARP et al., 1973). A embriogênese somática direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos e a embriogênese indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). O embrião maduro, com raras exceções, é uma estrutura bipolar plenamente desenvolvida, consistindo de um meristema em cada extremidade: a radícula ou primórdio radicular e a plúmula ou primórdio foliar e um dos dois apêndices laterais, os cotilédones (PASQUAL; PINTO, 1988).

As células-mãe embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento das células embrionárias em divisão ativa, independente do padrão direto ou indireto. Essas características incluem o tamanho pequeno (100 - 200µm), conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas dessas células sugerem intensa atividade metabólica e síntese de RNA (FUENTES et al., 2000).

Na maioria das plantas, a embriogênese somática direta é de difícil obtenção. Em café, a espécie *C. canephora* tem sido utilizada como modelo na grande maioria dos trabalhos em embriogênese direta, por ser uma espécie relativamente fácil de desencadear a formação de embriões somáticos em meio de cultura somente com citocininas (FUENTES et al., 2000). Dublin (1981)

mostrou que é possível induzir embriogênese em explantes foliares de *C. canephora* utilizando apenas o BAP (Benzilaminopurina). Essa observação foi confirmada por Hatanaka et al. (1991) e Yasuda, Fujii e Yamaguchi (1985) e que relataram a importância da citocinina e que auxinas podem ter efeitos inibitórios para embriogênese somática em *C. canephora*.

Entretanto, há poucos relatos da obtenção de embriogênese direta na espécie *C. arabica* (PEREIRA et al., 2007; REZENDE et al., 2008). Yasuda, Fujii e Yamaguchi (1985) estabeleceram a embriogênese somática em folhas velhas de *C. arabica* e de *C. canephora*, usando a citocinina como único regulador de crescimento.

De acordo com Pereira et al. (2007), o número de embriões somáticos diretos de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado obtido quando se utilizou cinetina e GA<sub>3</sub>, foi inferior quando comparado aos resultados de embriogênese somática indireta em *C. arabica* cv. Obatã obtidos por Maciel et al. (2003), os quais obtiveram proliferação de calos utilizando 2,4-D e cinetina, alcançando na etapa posterior, uma média de 310 embriões/explante.

Pereira et al. (2007), trabalhando com embriões somáticos diretos de *C. arabica* L. cv. Rubi obteve melhores resultados para comprimento da parte aérea com a utilização de 14,2 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e Cavalcante-Alves et al. (1999), trabalhando com *C. arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC-44, por meio da cultura de gemas ortotrópicas, obteve em maior número brotos maiores que 1cm em presença de 9 mg.L<sup>-1</sup> de BAP adicionado de 20,0 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

A embriogênese somática em *Coffea* apresenta tipos distintos de calos durante a fase de indução (CORDEIRO, 1999). Os primeiros trabalhos desenvolvidos na tentativa de eliminar ou diminuir a fase de calo na embriogênese somática do café foram relatados por Staristky e van Hasselt (1980). Esses autores mostraram que a resposta aos reguladores de crescimento utilizados é extremamente dependente da espécie doadora e da origem dos

explantes, mas estabeleceram, como regra geral, que altas concentrações de citocinina estimulam o desenvolvimento de embrioides e que auxinas favorecem a formação de calos.

O processo de embriogênese somática indireta requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, processo dependente da ação de reguladores de crescimento, não só para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação de estado embriogênico. Nesse aspecto, os embriões surgem de calos primários não diferenciados, que são formações de coloração marrom, globulares e mais ou menos compactas, situadas nos bordos dos explantes e contendo, no máximo, 20 embriões.explante<sup>-1</sup>. Surgem também de calos secundários embriogênicos friáveis, que originam cerca de 100 a 300 embriões.explante<sup>-1</sup>, quando cultivados em meio de cultura semissólido. Todavia, em cultura líquida, podem produzir cerca de 12.000 embriões de agregados celulares (BOXTEL; BERTHOULY, 1996).

Contudo, a embriogênese direta ou indireta tem sido utilizada com o objetivo de obtenção de tecido embriogênico em *Coffea*: a primeira envolve o cultivo de explante sobre um único meio de cultura, suplementado apenas com citocinina (HATANAKA et al., 1991) ou a combinação de auxina e citocinina (PIERSON et al., 1983). A segunda estratégia utiliza o cultivo de explantes em um meio primário ou de indução, seguido da transferência dos explantes para um meio secundário, tido como de diferenciação (DUBLIN, 1984) ou de acondicionamento, que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (ZAMARRIPA et al., 1991).

Vieira e Kobayashi (2000) asseguram que a embriogênese indireta é preferencialmente utilizada para estudos de multiplicação clonal de plântulas de cafeeiro, pois geralmente proporciona a formação de maior número de embriões somáticos. explante<sup>-1</sup>.

O suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura é essencial para o cultivo *in vitro*, podendo variar de acordo com a espécie vegetal e o processo de cultivo. A indução da embriogênese somática em explantes vegetais, assim como a multiplicação e crescimento de plântulas, são altamente dependentes da composição dos nutrientes minerais no meio de cultura (MONTEIRO-HARA, 2000).

A indução de embriogênese somática tem sido correlacionada com determinadas necessidades nutricionais; entretanto, poucos estudos têm sido dirigidos à análise do consumo dos componentes nutricionais, o que poderia levar a uma otimização do meio de cultura e, como consequência, a um melhor controle dos eventos embriogênicos (MACIEL et al., 2003).

A embriogênese somática indireta induzida em explantes foliares jovens de *C. arabica* é diretamente influenciada pelo tipo de explante e pelo meio de cultura (GOMEZ, 2010).

Diversas formulações de meio têm sido empregadas na cultura *in vitro*, as quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais. Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes. Um grande passo foi dado em 1962, com a publicação de um trabalho por Murashige e Skoog (1962), que determinaram a concentração de sais, estabelecendo o tão conhecido meio 'MS', que é o mais utilizado na propagação *in vitro* de *C. arabica*, promovendo resultados positivos na multiplicação de segmentos nodais, desenvolvimento de embriões e indução de embriogênese somática em explantes foliares (PEREIRA et al., 2007).

As plantas sintetizam todas as vitaminas requeridas para o seu crescimento e desenvolvimento normal, entretanto em meio de cultura são adicionadas vitaminas específicas, como a tiamina, o ácido nicotínico, a piridoxina e o mio-inositol, as quais são requeridas pelo explante *in vitro* (LUIS, 2008). Embora as células cultivadas sejam capazes de sintetizar todos os

aminoácidos exigidos, a adição de glutamina, cisteína, prolina e tirosina ou uma mistura de aminoácido como a caseína hidrolisada ao meio pode aumentar o crescimento celular (LUIS, 2008).

As concentrações de hormônios no meio de crescimento são determinantes para a maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (CASTRO; SENA; KLUGE, 2002)

As auxinas e as citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raízes, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento. Existem várias substâncias que pertencem a cada uma destas classes de reguladores e são utilizadas, de acordo com o objetivo do trabalho (SKOOG; MILLER, 1957).

As citocininas atuam na divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico. As principais citocininas utilizadas são: 6-benzilaminopurina (BAP), N-isopentilaminopurina (2ip), e zeatina (Zea) (GEORGE, 1993).

Os calos embriogênicos podem também ser cultivados em placas de Petri, em meio líquido em frascos *erlenmeyer* (BOXTEL; BERTHOULY, 1996), em biorreatores de imersão contínua (NORIEGA; SONDAHL, 1993), e biorreatores de imersão temporária (TEISSON; ALVARD, 1995).

## **2.4 Biorreatores**

A micropropagação convencional apresenta tendência de requerer grande número de recipientes pequenos, meio sólido e repicagens manuais do material vegetal em câmara de fluxo laminar. É necessário a transferência periódica das plântulas para novo meio de cultura, após 4 a 6 semanas de

cultivo, devido à exaustão do meio nutritivo e ao crescimento e a proliferação dos tecidos, os quais são rapidamente limitados pelo volume dos frascos (MAENE; DEBERGH, 1985).

O ágar adicionado ao meio de cultivo na propagação *in vitro* convencional pode limitar a automação no biorretor, além do trabalho necessário no processo de limpeza, distribuição de meio de cultura e manuseio de grande número de recipientes (MAENE; DEBERGH, 1985).

Os meios líquidos são ideais na micropropagação, por evitarem o emprego de agentes solidificantes do meio de cultura (como o ágar) e proporcionarem a possibilidade de automação do processo. Os sistemas de cultivo líquido podem providenciar muito mais uniformidade nas condições de cultivo; o meio pode ser facilmente removido sem a necessidade de se trocar o recipiente; a esterilização é possível através de filtração e a limpeza, após um período de cultivo, pode ser muito mais fácil. Em comparação com o cultivo em meio sólido, maiores recipientes podem ser usados e as repicagens podem ser reduzidas (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

Os biorreatores são sistemas usados na propagação clonal de diversas espécies e na produção de metabólitos secundários de plantas medicinais, os quais são os principais campos de pesquisa da cultura de tecidos vegetais (SAGAWA; KUNISAKI, 1989).

A propagação de plantas por meio de fermentadores com fins industriais é inviável, devido ao seu alto custo e, por isso, foram feitas modificações para seu emprego na propagação *in vitro* (BARRUETO CID; CRUZ; TEIXEIRA, 2002). Recentemente, os biorreatores começaram a ser utilizados para cultivo de células, tecidos, gemas e plântulas, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala.

A função básica de um biorreator é promover ótima condição de crescimento, devido ao controle de fatores físicos e químicos do ambiente do

cultivo, para a produção de tecidos vegetais em cultivos líquidos (PAEK; HAHAN; SON, 2001).

Os biorreatores, normalmente, utilizam frascos de maior volume do que os empregados na micropropagação convencional. Efeitos positivos na utilização de frascos maiores têm sido observados desde o relato de Monette (1983), obtendo maiores brotos de videira em frascos maiores. Harris e Mason (1983) afirmam que o maior volume do frasco proporciona a utilização de maior quantidade de meio de cultura, prevenindo deficiências de certos constituintes do meio. Para Etienne e Berthouly (2002), maior volume de meio pode ter efeito positivo na proliferação e no crescimento de plântulas *in vitro*.

O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para a propagação vegetal foi feito por Takayama e Misawa (1983) para micropropagação de begônia, a partir de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, de forma similar aos cultivos convencionais. Após esse primeiro trabalho, foram adaptados procedimentos para uma série de espécies vegetais (NORIEGA; SÖNDHAL, 1993).

Adaptação de biorreatores com meio líquido para micropropagação pode ser uma alternativa benéfica devido à facilidade da produção em escala, a capacidade de prevenir desordens fisiológicas de hiperidricidade nos brotos e folhas e, como resultado, tem-se a redução dos custos de produção. Entretanto, poucos biorreatores são usados na propagação comercial de plantas, devido à falta de experimentos e à complexa interação entre a fisiologia das plântulas cultivadas, nessas condições o próprio equipamento que possibilita aeração do material vegetal *in vitro* (PAEK; HAHAN; SON, 2001).

Os biorreatores também podem ser usados na produção de embriões somáticos e sementes sintéticas (ETIENNE et al., 2006).

Basicamente, existem dois modelos de biorreatores: os convencionais, de imersão contínua, que são aqueles que se desenvolveram a partir de

modificações dos fermentadores utilizados no processo industrial e os biorreatores de imersão temporária.

Geralmente, os biorreatores de imersão temporária (também conhecidos como sistemas de imersão temporária) são de mais simples manuseio que os biorreatores convencionais (ETIENNE et al., 2006).

A aeração do meio de cultura é feita de diferentes formas, sendo a mais comum a injeção de fluxo de ar a uma determinada pressão, combinada ou não com o movimento de uma hélice no interior do frasco de cultivo (TAKAYAMA; AKITA, 1994).

Nos biorreatores de imersão permanente, o material em cultivo permanece imerso continuamente no meio de cultura. Essa imersão pode causar problemas de hiperidricidade dos tecidos, órgãos e plântulas (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

Diferentes sistemas têm sido descritos desde Alvard et al. (1993) e incluem os mais recentes sistemas de imersão temporária. Eles são relativamente simples e de fácil utilização, possibilitando o contato entre todas as partes dos explantes com o meio líquido, juntamente com a renovação da atmosfera do cultivo pela ventilação forçada promovida por compressor de ar (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

O sistema operacional, geralmente, apresenta dois recipientes conectados, um contendo o material vegetal e o outro o meio nutritivo. Em um primeiro momento, é aplicada uma pressão positiva de ar no interior do frasco com meio de cultura, fazendo com que o líquido seja transferido para o frasco que contém os explantes. Depois de determinado período, o líquido retorna à sua posição original. Esse processo é controlado por temporizadores, os quais acionam válvulas solenoides de acordo com uma programação prévia, fazendo com que o ar entre no sistema. Com isso, é possível determinar a frequência (número de imersões por dia) e também a duração de cada imersão. Esses dois

fatores são, provavelmente, os mais importantes para determinar crescimento otimizado dos tecidos e células vegetais. Duas variantes desse sistema têm sido desenvolvidas e comercializadas: o sistema automático de imersão temporária - RITA® (*recipient for automated temporary system*) e sistema de frascos gêmeos BIT® (*twin flasks system*) (ETIENNE et al., 2006).

O sistema RITA® possui um frasco de 1 litro com dois compartimentos, um superior, no qual são colocados os explantes e outro inferior, contendo meio de cultura. A pressão é aplicada no compartimento inferior e faz com que o líquido atinja o compartimento superior. Os explantes ficam imersos em meio nutritivo de acordo com o tempo de aplicação de pressão. Durante o período de imersão, o ar é borbulhado através do meio e agita delicadamente os tecidos, renovando a atmosfera do recipiente e o excesso de pressão é eliminado por meio de saídas na parte superior do aparelho (ALBARRAN et al., 2004) – Figura 1.

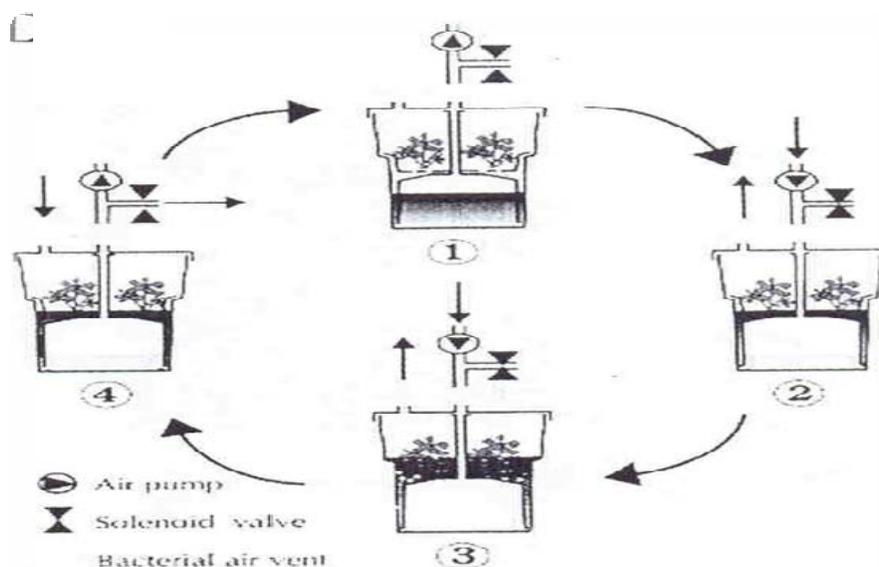


Figura 1 Biorreator de imersão temporária 'RITA'  
 Fonte: Etienne e Bertouly (2002) e Paek, Hahan e Son (2001)

Em sistemas de imersão temporária, está claro que o tempo de imersão e a sua frequência são muito importantes, determinando a absorção de nutrientes e controlando a hiperidricidade das plântulas (ETIENNE; BERTHOULY, 2002). A variação do tempo de imersão e sua frequência devem ser determinadas de acordo com as exigências de cada cultivo.

Escalant, Teisson e Côte (1994) mostraram que, em bananeira, após dois meses de cultivo, em sistema de imersão temporária, houve a formação de três vezes mais embriões somáticos do que os cultivados em meio sólido. Em seringueira, existe aumento da produção de embriões somáticos em quatro vezes, em sistema de imersão temporária, quando comparado com a metodologia convencional (ETIENNE et al., 1997). Em *C. arabica*, foi relatada a produção de 15 a 50 mil embriões somáticos, em biorreator de imersão temporária, por grama de inóculo (ETIENNE et al., 1997).

A natureza específica dos calos de alta frequência permite seu uso em cultivos líquidos. A produção de embriões somáticos no meio líquido tem sido utilizada para acelerar a propagação maciça de plantas de café (BOXTTEL; BERTHOULY, 1996; DUCOS et al., 2007). Neuenschwander e Baumann (1992) descreveram um protocolo para a embriogênese somática em cultivo líquido e obtiveram uma taxa de 94,5% embriões germinados. Afreen, Zobayed e Kozai (2002), Albarran et al. (2004), Barry-Etienne et al. (2002), Berthouly et al. (1995), Boxtel e Berthouly (1996), Ducos et al. (2007), Etienne et al. (1997) e Noriega e Söndahl (1993), obtiveram produção maciça de embriões somáticos de *C. arabica* L. utilizando biorreator de imersão temporária. Esse sistema permite a regeneração direta no recipiente e sem subcultivo das células suspensas. Em todos os trabalhos foram obtidas altas frequências de tecidos embriogênicos e regeneração de plantas.

Ducos et al. (2003), utilizando biorreator sob agitação, obtiveram 200-500 x 10<sup>3</sup> embriões somáticos de café.L<sup>-1</sup> de meio e Zamarripa (1003) descreveu

a embriogênese somática em *C. canephora* e Arabusta, relatando rendimentos de 400-500 x 10<sup>3</sup> embriões, após sete semanas. Ducos et al. (2007) mediram a capacidade de regeneração de plantas e afirmaram que 56.000 plântulas poderiam ser regeneradas ao partir de 1 g de calos.L<sup>-1</sup> de meio.

## 2.5 Aclimatização

A aclimatização consiste na transferência de plântulas micropropagadas *in vitro* para outro tipo de substrato e ambiente, com o objetivo de promover uma adaptação gradativa ao ambiente externo (MOREIRA et al., 2006). Esse processo representa uma etapa importante dentro de um programa no qual se trabalha com cultura de tecidos. Em alguns casos, chega a ser um fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

As folhas de plantas micropropagadas apresentam pouca quantidade de ceras epicuticulares, cutícula mais fina e baixa funcionalidade dos estômatos sob condições de baixa umidade relativa do ar. As raízes são, de modo geral, quebradiças, pouco funcionais na absorção de água e nutrientes e, frequentemente, morrem ao serem transferidas para o solo, já que há poucas conexões vasculares entre raízes e brotações (GEORGE, 1996).

O fenótipo das plantas que crescem *in vitro* é caracterizado por apresentar caules mais curtos e delgados, redução de tecidos de suporte, incremento do conteúdo de água nas células, pequena capacidade fotossintética e estômatos com baixa funcionalidade. As plantas micropropagadas têm, em geral, um mecanismo heterotrófico em relação à fonte de carbono (PASQUAL, 2000).

O processo de aclimatização é crucial para a obtenção de mudas de alta qualidade, provenientes da cultura de tecidos. A otimização do processo de aclimatização envolve suprimento adequado de nutrientes, o uso de substratos

adequados, utilização de substâncias reguladoras de crescimento, controle do ambiente de cultivo, entre outros cuidados (CATUNDA, 2004).

Nesse sentido, deve-se encontrar um substrato que seja uniforme em sua composição, rico em nutrientes, apresentando elevada capacidade de retenção de água e troca catiônica, ser isento de pragas, patógenos e sementes de plantas daninhas e, ainda, ser viável economicamente (MELO, 1999). Em linhas gerais um bom substrato é aquele que é firme e denso, o suficiente para manter a estrutura de propagação, em condições até a germinação ou enraizamento e que não encolha ou expanda com a variação de umidade (HOFFMANN, 1999). A finalidade mais importante de um substrato é produzir uma planta (ou muda) de alta qualidade, em menor tempo e a baixo custo (ABREU; ABRE; BATAGLIA, 2002).

Rodrigues et al. (2005) demonstraram o desempenho superior do substrato Plantmax® e areia lavada na aclimatização de mudas micropropagadas de Helicônia. Zemke et al. (2003), avaliando substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta enxertos de videira micropropagados, concluíram que o substrato comercial Plantmax® aumenta a biomassa vegetal, apesar de diminuir a colonização micorrízica. Segundo Pereira et al. (2007), a utilização do substrato Plantmax® para a aclimatização de abacaxi ornamental proporcionou uma taxa sobrevivência de 96,67%.

O substrato PlantMax® foi utilizado com excelentes resultados, em termos de pegamento e crescimento das mudas. A avaliação das plantas aclimatadas é conduzida tomando como base a percentagem de pegamento, número de folhas e altura das plantas após um, dois, três e quatro meses de cultivo (TEIXEIRA et al., 2004).

Uma função do substrato é nutrir a planta adequadamente. Porém, devido à sua composição, nem sempre o substrato contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas. É necessário, então, acrescentar

o adubo para que o nível de nutrientes disponíveis esteja à altura do bom desenvolvimento das plantas (MINAMI, 2000). Melo (1999) avaliou o efeito de concentrações crescentes de fertilizante de liberação lenta em mudas de cafeeiro utilizando substrato comercial. Os resultados indicaram que a dose de 450 gramas do fertilizante de liberação lenta, formulação 15-10-10 + micronutrientes, em 55 litros do substrato (8,18kg de fertilizante.m<sup>-3</sup> de substrato) promoveu melhor desenvolvimento das mudas.

Experimento conduzido por Paiva et al. (1997) com cafeeiro demonstrou, para as características altura das plantas, diâmetro do caule e massa seca da parte aérea e da raiz, que a presença do fertilizante de liberação lenta no substrato proporcionou melhores resultados do que a testemunha com fertilizante convencional, além de uma antecipação de aproximadamente 20 dias na liberação das mudas de café para o plantio em campo.

A transferência dos embriões somáticos com cotilédones ainda pouco desenvolvidos para o substrato contendo 2 partes de solo: 1 parte de areia:1 parte de palha de café apresenta grande eficiência no processo de aclimação com aproximadamente 73% de pegamento (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

A embriogênese somática em *Coffea arabica* L., apresenta um elevado potencial para a produção de mudas em larga escala e em curto período de tempo, onde a fase de aclimatização é essencial para o sucesso dessa tecnologia (BARRY-ETIENNE et al., 2002).

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. F.; ABREU, C. A.; BATAGLIA, O. C. Uso da análise química na avaliação da qualidade de substratos e componentes. In: FURLANI, A. M. C. et al. **Caracterização, manejo e qualidade de substratos para a produção de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, 2002. p. 17-28. (Documentos IAC, 70).
- AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large escale plantlet conversion form cotyledonary embryos. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 21-29, 2002.
- ALBARRAN, J. et al. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 27-36, 2004.
- ANDRADE, L. M. C. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- BARRUETO CID, P.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de imersão permanente Biotecnologia. **Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 25, p. 50-53, mar./abr. 2002.
- BARRY-ETIENNE, D. et al. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plant in the nursery. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 2, p. 153-162, 2002.
- BERTHOULY, M. et al. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1995. p. 514-519.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Somatic embryogenesis of coffee (Ed.). In: SERA, T. et al. **Coffe biotechnology and quality**. Londrina: SIBAC, 2000. v. 1, p. 71-90.

BOXTTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, p. 4-17, 1996.

CAIXETA, E. T. et al. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro (Ed). In: CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. v.1, p. 103-124.

CARVALHO, C. H. C. Cultivares de café arábica de porte baixo. In: \_\_\_\_\_. **Cultivares de café**. Brasília: EMBRAPA, 2008. p.157-224.

CARVALHO, C. H. S. et al. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro 'Catuaí Vermelho' propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 378-383, 2011.

CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. 55 p.

CATUNDA, P. H. A. **Aclimatização de plântulas micropropagadas**. 2004. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CAVALCANTE -ALVES, J. M. et al. Micropropagação de *Coffea arabica* L.: influência de BAP e GA3. **Unimar Ciências**, Marília, v. 8, n. 4, p. 95-100, 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café: primeira estimativa**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 24 out. 2011.

CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplastos em Coffea**. 1999. 11 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

DUBLIN, P. Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 25, p. 237-242, 1981.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "in vitro" et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, Paris, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.

DUCOS, J. P. et al. Agronomic performance of *Coffea canephora* P. tress derived form large-scale somatic embryo production in liquid medium. **Euphytica**, Wageningen, v. 131, p. 215-223, 2003.

DUCOS, J. P.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Bioreactors for coffee propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of Plant Developmental Biology**, Ikenobe, n. 1, v. 1, p. 1-12, 2007.

DUCOS, J. P. et al. Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. **Phytochemistry Reviews**, Heidelberg, v. 7, p. 607-613, 2008.

ESCALANT, J. V.; TEISSON, C.; CÔTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cell Development Biology Plant**, Marlboro, v. 30, n. 4, p. 181-186, Oct. 1994.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Pant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 215-231, June 2002.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, p. 1031-1038, 2001.

ETIENNE, H. et al. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Phisiology**, Campos de Goitacazes, v. 18, n. 1, p. 45-54, 2006.

ETIENNE, H. et al. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Mull. (Arg. Using) the temporary immersion technique. **In Vitro Cell Development Biology**, Marlbor, v. 33, p. 81-87, 1997.

FUENTES, S. R. L. et al. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *C. canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 60, p. 5-13, 2000.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. In: \_\_\_\_\_. **Pratice**. 2nd. ed. Edington: Exegetis, 1996. 1361 p. Part 2.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. In: \_\_\_\_\_. **The technology**. 2nd. ed. Edington: Exegetis, 1993. 574 p. Pat 1.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA- CNPH, 1990. p. 99-160.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. p. 533-568.

HARRIS, R. E.; MASON, E. B. Two machines for in vitro propagation plants in liquid media. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 63, n. 1, p. 311-316, 1983.

HATANAKA, T. et al. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 179-182, 1991.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta enxertos de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M 26’**. 1999. 240 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

LUIS, Z. G. **Propagação in vitro e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (Byrsonina basiloba Juss. Malpighiaceae)**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MACIEL, A. L. R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.

MAENE, L.; DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. **Plant Cell tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 23-33, 1985.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento, 2005. 434 p.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; CARVALHO, C. H. S. Desenvolvimento de novas cultivares de café arábica (Ed). In: CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008. v. 1, p. 79-102.

MELO, B. **Estudos sobre produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes**. 1999. 119 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

MINAMI, K. Adubação em substrato. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese, 2000. p. 147-152.

MONETTE, P. L. Influence of size of culture vessel on in vitro proliferation of grape in liquid médium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 2, n. 4, p. 327-332, 1983.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Cultivo in vitro de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2000.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T. W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 608-612, 1992.

NORIEGA, C.; SONDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embriogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15., 1993, Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, 1993. p. 73-81.

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of biorreactores for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cell Developmental Biology – Plant**, Wallingffprd, v. 37, n. 2, Mar./Apr. 2001.

- PAIVA, L. C. et al. Efeitos de fontes de fertilizante de liberação controlada (Osmocote) na produção de mudas de cafeeiro (*C. arabica* L.) em tubetes. In: SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/CNPQ, 5. 1997, Lavras; CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 10., 1997, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1997. 79 p.
- PASQUAL, M.; PINTO J. E. B. Cultura de embriões. **Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, Brasília, v. 9, p. 2-12, 1988.
- PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 2000. 80 p.
- PEREIRA, A. R. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, 2007.
- PIERSON, E. S. et al. In vitro development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, Vienne, v. 115, n. 2/3, p. 208-216, 1983.
- REZENDE, J. C. et al. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas de embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.
- RODRIGUES, P. H. V. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba. v. 62, n. 3, p. 299-301. 2005.
- SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J. T. Micropropagation of floricultural crops. In: AMMIRATO, P. V. et al. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 22-56.
- SHARP, W. R. et al. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. **Phyton**, Buenos Aires, v. 31, p. 67-74, 1973.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* (Biological action of growth substances). **Symposium of the Society Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 116-131, 1957.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 19, p. 509-514, 1970.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 147-156, Nov. 1994.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. The mass propagation of lilum in vitro through stimulation of multiple adventitious bulbsacale formation and through shake culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, n. 1, p. 224-228, Jan. 1983.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic, 1995. p. 105-110.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p.

VIEIRA, L. G. E.; KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1.; 2000, Poços de Caldas. **Palestras...** Brasília: Embrapa Café, 2000. 374 p.

YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v. 26, p. 595-597, 1985.

ZAMARRIPA, A. **Etude et développement de l'embryogenèse somatique em milieu liquide Du caféir (*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et l'hibryde Arabusta)**. Rennes, França: Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 1993. 191 p. Tese de Doutorado.

ZAMARRIPA, A. et al. Productio d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café, Cacao e Thé**, Paris, v. 35, n. 4, p. 233-244, 1991.

ZEMKE, J. M. et al. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta enxertos de videira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1309-1315, 2003.

**CAPÍTULO 2 Micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática em  
biorreator de imersão temporária**

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática em biorreator de imersão temporária. Os experimentos foram instalados e conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Fundação Procafé, em Varginha – MG, onde foram realizados 4 experimentos. Os materiais vegetais utilizados foram as plantas matrizes 03, 05 e 18 da população Siriema (*Coffea arabica* x *C.racemosa*). Experimento 1: utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, sendo os tratamentos constituídos por 2 meios de cultura, o “T3” e o “MM” e 2 tipos de calos: claros e escuros, com 6 repetições. Avaliou-se aos 60 dias a massa fresca final dos calos, o aumento da massa dos calos, a densidade final das células e a porcentagem do incremento de calos embriogênicos. Experimento 2: os tratamentos constituíram-se por diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup>) adicionados ao meio de cultura “RM” acrescido de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de prolina. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições. Após 60 dias, avaliou-se o número total de embriões globulares. Experimento 3: o meio nutritivo utilizado foi o “RR” acrescido de diferentes concentrações de Prolina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g.L<sup>-1</sup>) e de ANA (20 mg.L<sup>-1</sup>) em todos os tratamentos. Após 120 dias, avaliou-se o número total de embriões globulares. Experimento 4: os tratamentos foram constituídos pelos meios de cultura: T5A, T5A 1, T5A 2, T5A3 e T5A4 com 6 repetições, sendo inoculados aproximadamente 500 embriões por biorreator. Após 84 dias, avaliou-se: número de embriões germinados, porcentagem de plântulas pequenas, médias e grandes e porcentagem de plântulas pequenas, médias e grandes com raízes. O meio de cultura “MM” apresenta a maior multiplicação de calos, o ANA e a prolina promovem maior número de embriões e o emprego de biorreator de imersão temporária é eficiente no processo de conversão de embriões somáticos em plântulas.

Palavras-chave: Biotecnologia. *Coffea arabica* L. Cultura de tecidos.

## ABSTRACT

For coffee, the importance of combining techniques of biotechnology, bioreactor using the conventional breeding programs, it is undeniable to maintain Brazil as the largest producer in the world. This work was carried out in order to optimize the coffee micropropagation through somatic embryogenesis by temporary immersion bioreactor. The experiments were conducted and the Laboratory of Plant Tissue Culture Foundation Procafé in Varginha - MG. The plant materials used in the experiments were clones 03, 05 and 18 of the population Siriema (*Coffea arabica* x *Coffea racemosa*). Experiment 1: We used calli of *C. arabica* (clone 5) from the culture media "SM" and "T3" in primary culture. We used a completely randomized in a 2x2 factorial design, with treatments consisting of two media, the "T3" and "MM" and two types of callus: light and dark, with six repetitions. Was evaluated at 60 days the fresh weight of callus, the increased weight of the callus, the final density of cells and the percentage increase from the callus. Experiment 2: We used calli of *C. arabica* (clone 18) from the culture medium for multiplication "T3". The treatments consisted of five different concentrations of NAA (0.00, 0.25, 0.50, 1.00 and 2.00 mg.L<sup>-1</sup>) added to the culture medium "RM" plus 1.0 gL<sup>-1</sup> of proline. The experimental design was completely randomized, with six repetitions. The evaluations were conducted after 60 days, when we assessed the total number of globular embryos. Experiment 3: We used calluses of *C. arabica* (clone 03) from the culture medium for multiplication "T3". The nutrient medium used was the "RR" plus different concentrations of proline (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 gL<sup>-1</sup>) and ANA (20 mg.L<sup>-1</sup>) in all treatments. The evaluations were conducted after 120 days, when we assessed the total number of globular embryos. Experiment 4: We used embryos of *C. arabica* (clone 03) from culture media "RR" plus 1.0 g L-proline 1. The treatments were consisted by medium culture: T5A, T5A 1, 2 T5A, T5A3 and T5A4 with 6 replicates and ± 500 embryos inoculated per bioreactor. Evaluations were performed at 84 days, to evaluate: the number of embryos germinated, % small, medium and large plantlets and % small, medium and large plantlets with roots. The culture medium "MM" has the highest proliferation of calli, the NAA and proline promote greater number of embryos and the use of temporary immersion bioreactor is efficient in the conversion process of somatic embryos into plantlets.

Keywords: Biotechnology. *Coffea arabica* L. Tissue culture.

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as técnicas biotecnológicas utilizadas em *Coffea arabica*, a embriogênese somática é um importante método de propagação *in vitro*, pois consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, sem que haja fusão de gametas, possibilitando assim, a propagação vegetativa acelerada e uniformidade genética de clones superiores, apresentando grande potencial a ser explorado (REZENDE et al., 2008).

A indução embriogênica somática está relacionada às alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico (MERKLE; PARROTT; FLINN, 1995). No entanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura (LOYOLA-VARGAS et al., 1999). Diversas formulações de meio de cultura têm sido empregadas na cultura *in vitro*, as quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais. O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais utilizado na propagação *in vitro* de *C. arabica*, promovendo resultados positivos na indução de embriogênese somática em explantes foliares (MACIEL et al., 2003; PEREIRA et al., 2007; REZENDE et al., 2008).

Nos meios de cultura são adicionadas vitaminas específicas, como a tiamina, o ácido nicotínico, a piridoxina e o mio-inositol, as quais são requeridas pelo explante *in vitro*. Embora as células cultivadas sejam capazes de sintetizar todos os aminoácidos exigidos, a adição de glutamina, cisteína, prolina e tirosina ou uma mistura de aminoácido como a caseína hidrolisada ao meio pode aumentar significativamente o crescimento celular (LUIS, 2008).

A multiplicação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, dependente da ação de reguladores de crescimento, não só para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação de estado

embriogênico. A multiplicação pode ser realizada em placas de Petri ou em meio líquido (CARVALHO et al., 2011).

As concentrações e a relação auxina/citocinina variam grandemente entre os protocolos. Boxtel e Berthouly (1996) estudando várias concentrações de reguladores de crescimento em meio de multiplicação, obtiveram a melhor taxa de proliferação de calos na presença de 2,4-D ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), AIB ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 2ip ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Em trabalhos realizados por Teixeira et al. (2004), são utilizados cinetina ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

O aumento da concentração de ANA reduz significativamente o crescimento dos calos em regeneração e induz a formação de embriões globulares mais precocemente. No meio com  $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA praticamente não há crescimento do calo durante a regeneração e os embriões globulares formam-se em dois meses. Nos meios com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA há crescimento dos calos e os embriões só atingem o estágio globular e ficam prontos para transferência para a fase de maturação com quatro meses. Todavia, devido ao crescimento dos calos durante este período há formação de maior número de embriões globulares por grama de calo plaqueado (CARVALHO et al., 2011).

No cafeeiro, é comum a adição de BAP para aumentar o crescimento da parte aérea de embriões somáticos em fase inicial de germinação (PEREIRA, 2007) e da combinação de uma citocinina e uma auxina durante a fase cotiledonar, para induzir a formação de raízes e completar a germinação do embrião (ANDRADE et al., 2001).

Para acelerar o processo de desenvolvimento dos embriões, pode-se utilizar biorreatores, que são sistemas usados na micropropagação de plantas, podendo ser uma alternativa viável para a otimização do processo e a redução dos custos de produção. Esse sistema permite a renovação do ar no ambiente *in*

*vitro*, aumentando a produção de biomassa vegetal propagada com redução do tempo requerido para a propagação *in vitro*.

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar meios de cultura na multiplicação de calos embriogênicos, ANA e prolina na regeneração de embriões somáticos e BAP e AIA na maturação de embriões via biorreator de imersão temporária tipo RITA®.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização geral dos experimentos

Os experimentos foram instalados e conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Fundação Procafé, em Varginha – MG.

Os meios de cultura utilizados no presente trabalho seguem uma sequência de modificações de acordo com as etapas distintas da embriogênese somática, como está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Componentes dos meios de culturas utilizados durante as etapas a embriogênese somática em *C. arabica* L. UFLA, Lavras-MG, 2011

Componentes	Concentração Final (mg.L <sup>-1</sup> )						
	MI	T3 <sup>1</sup>	SM <sup>2</sup>	MM <sup>2</sup>	RM <sup>2</sup>	RR <sup>2</sup>	T5 <sup>2</sup>
Macronutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS
Micronutrientes	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	13,90	13,90	13,90	13,90	13,90	13,90	3,90
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	18,65	18,65	18,65	18,65	18,65	18,65	18,65
Tiamina-HCl	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Piridoxina-HCl	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ácido Nicotínico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Glicina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mio-inositol	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Caseína Hidrolisada	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-
Extrato de malte	400,0	200,0	800,0	-	400,0	-	-
Ácido Cítrico	-	-	-	250,0	-	-	-
Cinetina	-	1,00	-	-	-	-	-
2,4-D	4,0	0,45	2,0	0,50	-	-	-
AIB	2,0	-	-	1,00	-	-	-
ANA	-	-	-	-	-	10,0	-
2ip	4,0	-	-	2,00	-	2,0	-
BAP	-	-	-	-	2,00	-	2,0
Sacarose (g)	20	30	20	20	30	30	-
Phytigel	2,4	-	-	-	-	3,4	-

<sup>1</sup>Boxtel e Berthouly (1996)

<sup>2</sup>Teixeira et al. (2004)

Os meios de cultura, em todos os experimentos, tiveram o pH ajustado para  $5,6 \pm 0,1$ , utilizando NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, antes do processo de autoclavagem, realizado a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm por 20 minutos, GA3 e 2ip foram filtrados e adicionados após a autoclavagem.

## 2.2 Material vegetal

Os materiais vegetais utilizados nos quatro experimentos foram plantas matrizes 03, 05 e 18 da população Siriema (*Coffea racemosa* x *Coffea arabica*), selecionadas para resistência à ferrugem e ao bicho-mineiro e à elevada produtividade.

## 2.3 Experimento 1: multiplicação de calos embriogênicos

Foram utilizados para a instalação do experimento calos embriogênicos da matriz 05 induzidos nos meios de cultivo “MI” e “SM” (Tabela 1).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 2$ , sendo os tratamentos constituídos por dois meios de cultura líquidos, o “T3” e o “MM” (Tabela 1) e dois tipos de calos embriogênicos com colorações distintas: claros e escuros, com 6 repetições.

Em câmara de fluxo laminar foram vertidos 20mL dos meios líquidos “T3” e “MM” em recipiente do tipo *Erlenmeyer*, com capacidade de 125mL e, em seguida, inoculados 200 mg de calos embriogênicos. Os recipientes foram vedados com papel laminado e levados para um agitador orbital a 100 rpm, sob obscuridade e com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os calos embriogênicos foram subcultivados a cada 20 dias.

As avaliações foram realizadas 60 dias após a instalação do experimento, por meio da pesagem dos calos embriogênicos, com o auxílio de uma balança de precisão colocada em uma câmara de fluxo laminar.

Avaliou-se neste experimento a massa fresca final dos calos embriogênicos (MFFCE), o aumento da massa dos calos embriogênicos (AMCE), a densidade final das células (DFC) e a porcentagem do incremento de calos embriogênicos (%I).

O Aumento da Massa dos Calos Embriogênicos foi calculado pela fórmula:

$$\text{AMCE} = \text{MFFCE}/\text{MF}_{\text{Inicial}}$$

A Densidade Final das Células foi calculada pela fórmula:

$$\text{DFC} = \text{MFFCE} \cdot \text{L}^{-1} \text{ de meio de cultura}$$

A Porcentagem de Incremento de Calos Embriogênicos foi calculada pela fórmula:

$$\text{I}(\%) = [(\text{MFFCE} \cdot 100 / \text{MF}_{\text{Inicial}}) - 100]$$

onde, a  $\text{MF}_{\text{Inicial}}$  é a Massa Fresca dos Calos Embriogênicos Inoculados = 200 mg por 20 mL de meio de cultura, ou seja, 10g de calos embriogênicos por litro de meio de cultura.

#### **2.4 Experimento 2: ácido naftaleno acético na regeneração de embriões globulares**

Foram utilizados para a instalação do experimento calos da planta matriz 18, previamente cultivados em meio de cultura de multiplicação “T3” (Tabela 1).

Os tratamentos foram constituídos por cinco concentrações de ANA ( 0,00; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura “RM” (Tabela 1) com a adição de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de prolina.

O delineamento experimental utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições.

Cada repetição foi formada por 20mL do meio líquido em recipiente do tipo *Erlenmeyer*, com capacidade de 125mL e, em seguida, inoculados com 20 mg de calos embriogênicos.

Os recipientes foram vedados com papel laminado e levados para um agitador orbital a 100 rpm, no escuro e com temperatura de 25± 2°C. Os calos embriogênicos foram subcultivados a cada 20 dias.

As avaliações foram realizadas 60 dias após a instalação do experimento, quando se determinou o número total de embriões globulares.

#### **2.5 Experimento 3: prolina na regeneração de embriões**

Foram utilizados para a instalação do experimento calos da planta matriz 03, previamente cultivados em meio de cultura de multiplicação “T3” (Tabela 1).

Estudou-se o efeito da adição de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g.L<sup>-1</sup> de prolina no meio de cultura “RR” (Tabela 1) com 20 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, sobre regeneração de embriões em placas de Petri.

Após autoclavados, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri em câmara de fluxo laminar. Foram inoculados quatro setores de 100mg de calos embriogênicos em cada placa de Petri.

Os calos embriogênicos foram inoculados assepticamente em meio nutritivo na câmara de fluxo laminar horizontal e transferidos para sala de crescimento na ausência de luz, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Os calos embriogênicos foram subcultivados a cada 30 dias por 120 dias.

Após esse período foi avaliado o número total de embriões globulares.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e quatro setores embriogênicos de 100mg cada.

#### **2.6 Experimento 4: BAP e AIA na maturação de embriões em biorreator tipo Rita®**

Foram utilizados para a instalação do experimento embriões globulares de *C. arabica* (clone 03) oriundos dos meios de cultura “RR” 20 acrescido de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  prolina (Tabela 1).

Nesse experimento, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos pelos meios de cultura:

- a) T5A (Tabela 1)
- b) T5A 1: T5A com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP
- c) T5A 2: T5A com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA
- d) T5A3: T5A com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA
- e) T5A4: T5A com  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA

Os tratamentos constituíram-se de seis repetições, ou seja, de seis biorreatores de imersão temporária tipo RITA®, sendo inoculados

aproximadamente 500 embriões globulares por biorreator em 500 mL de meio de cultura. Cada biorreator com capacidade para 1 litro.

Os embriões ficaram imersos em meio nutritivo a cada 12 horas por um período de três minutos e mantidos no escuro a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após seis semanas foi realizado o subcultivo dos embriões e adicionou-se a cada meio de cultura  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  após a autoclavagem. Os embriões permaneceram no escuro por mais um período de quatro semanas e em seguida foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , por duas semanas.

Aos 84 dias após a instalação do experimento, foram avaliados: o número de embriões cotiledonares por biorreator (NEC), a porcentagem de embriões cotiledonares pequenos (0,50-1,5cm), médios (1,5-2,5cm) e grandes (2,5-5,0cm) e a porcentagem de embriões cotiledonares pequenos, médios e grandes com raízes.

## **2.7 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias foram analisadas através do teste de agrupamento de médias Skott Knott e por regressão polinomial.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Experimento 1: multiplicação de calos embriogênicos

Houve efeito significativo para as características analisadas apenas para os meios de cultura ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 Análise de variância para as características massa fresca final de calos embriogênicos (MFFCE), aumento da massa de calos embriogênicos (APCE), densidade final das células (DFC) e porcentagem do incremento de calos embriogênicos (%I). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio			
		MFFCE (g)	AMCE (vezes)	DFC (g.L <sup>-1</sup> )	I (%)
Meio	1	3,004**	75,117**	3,004**	751170,4**
Calo	1	0,469ns	11,745ns	0,469ns	117453,0ns
Meio*Calo	3	0,321ns	8,041ns	0,321ns	80417,3ns
Erro	20	0,267	6,697	0,267	66972,8ns
C.V. (%)		38,67	38,67	45,46	45,46

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Calos embriogênicos apresentaram maior taxa de multiplicação quando cultivados em meio de cultura “MM” (Tabela 3). Boxtel e Berthouly (1996) estudando várias concentrações de reguladores de crescimento em meio de multiplicação, obtiveram a maior taxa de proliferação de calos na presença de 2,4-D (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), AIB (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e 2ip (2,0 mg.L<sup>-1</sup>).

A coloração dos calos embriogênicos não afetou significativamente a taxa de multiplicação dos calos cultivados nos diferentes meios de cultura.

Aos 60 dias de cultivo após a instalação do experimento, a matéria fresca final dos calos embriogênicos foi de 1,69g em meio de cultura “MM” e de 0,98g em meio “T3” (Tabela 3).

O aumento da massa fresca final, e conseqüentemente, a multiplicação dos calos, pode estar relacionado ao elevado conteúdo da água intracelular, que ocorre em células embriogênicas em diferentes estádios (BERTOLDI et al., 2004).

Os resultados de multiplicação de calos embriogênicos corroboram com os obtidos por Rezende et al. (2008), que estudando sistemas de cultivo líquido, o meio de cultura de Teixeira et al. (2004) produziu, aos 63 dias de cultivo, 1,12 g de calos embriogênicos.

Analisando a Tabela 3, verifica-se que o número de vezes em que os calos embriogênicos aumentaram foi mais elevado no meio de cultura líquido "MM".

No meio de cultura "MM" o aumento dos calos foi de 8,4 vezes enquanto para o meio T3 foi de 4,9 vezes para uma densidade inicial de cultivo de 10 g.L de meio<sup>-1</sup>. De acordo com os protocolos, no meio de cultura "MM" foram adicionadas as auxinas 2,4-D (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e AIB (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e a citocinina 2ip (2,0 mg.L<sup>-1</sup>); enquanto que no meio "T3" utilizou-se a combinação de cinetina (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (0,45 mg.L<sup>-1</sup>). É provável que essas diferentes relações de auxina/citocinina utilizadas nos diferentes meios de cultura tenham influenciado a multiplicação dos calos embriogênicos.

Ao contrário, auxinas não são necessárias para a maioria dos genótipos de *C. canephora* durante o processo de multiplicação de calos embriogênicos (DUCOS; LAMBOT; PETIARD, 2007). Yassuda et al. (1985) também obtiveram sucesso na multiplicação de calos embriogênicos em *C. canephora* utilizando meio de cultura com apenas citocinina como regulador de crescimento.

Teixeira et al. (2004) verificaram aumento de densidade de células embriogênicas em meio de cultura "MM" próximo a cinco vezes após 28 dias,

dez vezes após 56 dias e quinze vezes após 86 dias e a densidade chegou a  $119\text{g.L}^{-1}$ .

A densidade final de calos foi mais elevada no meio de cultura “MM” com  $74,54\text{g.L}^{-1}$  de calos embriogênicos e  $39,02\text{g.L}^{-1}$  para o meio “T3” (Tabela 3).

Analisando a Tabela 3 observou-se o incremento na porcentagem de multiplicação de calos embriogênicos para cada meio de cultura. O meio “MM” apresentou um incremento em massa de calos embriogênicos de 746,1% (incremento de 12,4% ao dia) e para o meio “T3” de 392,3% (incremento de 6,5% ao dia).

De acordo com os resultados obtidos por Rezende et al. (2008), os incrementos na porcentagem de multiplicação de calos embriogênicos para os meios “T3” e “MM” foram semelhantes entre si, cerca de 15,5% ao dia quando se utilizou o meio T3 e de, aproximadamente, 18% quando o meio MM foi utilizado, indicando que os meios de cultura apresentam comportamento muito próximos, em diferentes genótipos de *C. arabica*.

Tabela 3 Média dos valores da massa fresca final de calos embriogênicos (MFCA), do aumento do peso dos calos embriogênicos (APCE), da densidade final das células (DFC) e da porcentagem do incremento de calos embriogênicos (I%) em diferentes meios de cultura. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Meios de Cultura	Características Avaliadas			
	MFCA (g)	AMCE (vezes)	DFC ( $\text{g.L}^{-1}$ )	I (%)
T3	0,98b	4,92b	39,02b	392,3b
MM	1,69a	8,46a	74,54a	746,1a

As médias seguidas da mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo e não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott.

### 3.2 Experimento 2: ácido naftaleno acético na regeneração de embriões globulares

Houve efeito significativo para as concentrações de ácido naftaleno acético, ANA, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 4).

Tabela 4 Análise de variância para a característica número de embriões. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio
		Número de Embriões
ANA	4	830,13**
Erro	20	159,39
C.V. (%)		43,19

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

A utilização de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA ao meio de cultura “RM” promoveu a formação de 47,37 embriões globulares para cada 20mg de calos embriogênicos.

As concentrações de ANA seguiram um modelo linear, sugerindo um incremento nas concentrações de auxina, com o objetivo de elevar esse número de embriões.

De modo geral, baixas concentrações de auxinas favorecem o crescimento normal de embriões e o crescimento radicular, enquanto altas concentrações tanto apresentam efeito inibitório quanto favorecem a formação de calos (PILET; SAUGY, 1987).

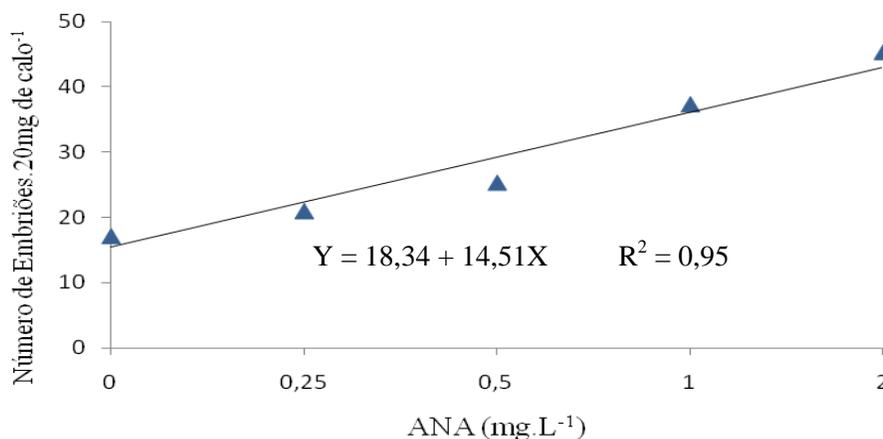


Figura 1 Número de embriões obtidos em meio “RM” de regeneração sob diferentes concentrações de ANA (mg.L<sup>-1</sup>). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Teixeira et al. (2004) utilizando também o meio “RM” acrescido de BAP e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, após dois meses de cultivo verificou que 71,3% dos genótipos em estudo apresentavam algum grau de regeneração, enquanto 28% não apresentavam formação de embriões. De acordo com os dados do presente trabalho, a densidade de células utilizadas foi exatamente a mesma citada por Teixeira et al. (2004), 1g.L<sup>-1</sup>.

### 3.3 Experimento 3: prolina na regeneração de embriões globulares

O resumo da análise de variância está representado na Tabela 5. Pode-se observar que a concentração de Prolina foi significativa ao nível de 1% de probabilidade para a variável número de embriões.

Tabela 5 Análise de variância para a característica número de embriões. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio
		Número de Embriões
Prolina	4	76544,240**
Erro	20	21295,080
C.V. (%)		44,52

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

A influência das concentrações de Prolina no número de embriões globulares pode ser observada na Figura 2. A maior formação de embriões ocorreu quando foram adicionadas ao meio de cultura 4,0g.L<sup>-1</sup> de Prolina, verificando-se, assim, uma tendência linear, indicando que o incremento de concentrações mais elevadas de Prolina apresenta influência positiva no aumento dessa variável.

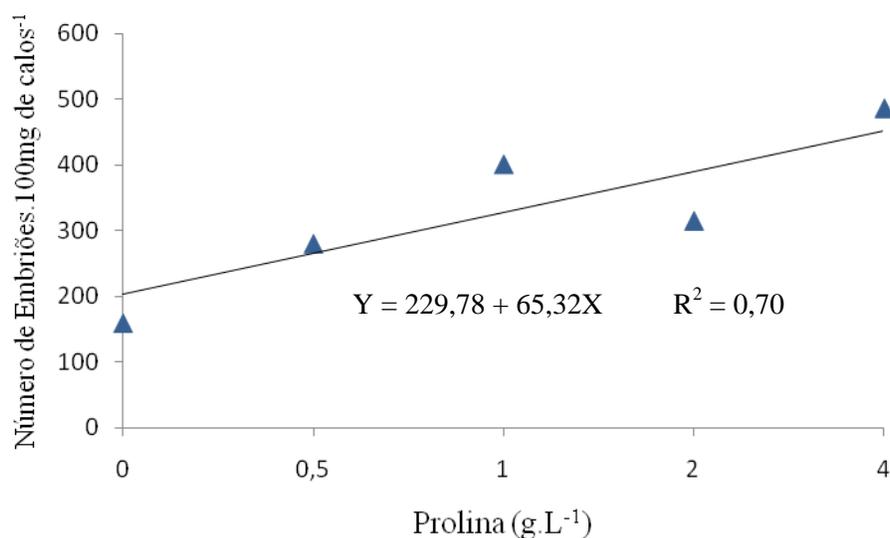


Figura 2 Número de embriões globulares obtidos em meio "RM" sob diferentes concentrações de Prolina (g.L<sup>-1</sup>). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Muruganatham et al. (2010) avaliando o efeito de aminoácidos na maturação de embriões somáticos de *Vigna mungo*, concluíram que diferentes concentrações de prolina (10, 20, 30 e 40 mg.L<sup>-1</sup>) adicionadas ao meio de cultura, inibiram a produção de embriões, resultados estes divergentes daqueles obtidos no presente trabalho.

Os resultados obtidos no experimento confirmam a ação da prolina adicionada ao meio de cultura, pois esse aminoácido atua como um regulador osmótico, um protetor contra a desnaturação enzimática, reserva de carbono e nitrogênio e como um estabilizador da síntese de proteína (LUIS, 2008). Evidenciando dessa maneira, o aumento de embriões globulares em concentrações crescentes de prolina.

### 3.4 Experimento 4: BAP e AIA na maturação de embriões em biorreator tipo Rita®

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão representados na Tabela 6. Observa-se que houve efeito significativo para as características porcentagem de embriões cotiledonares pequenos, médios e grandes para os diferentes meios de cultura ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 6 Análise de variância para as características número de embriões cotiledonares (NEC), % de embriões cotiledonares pequenos (%ECP), médios (%ECM) e grandes (%ECG), % de embriões cotiledonares pequenos com raízes (%ECPR), médios com raízes (%ECMR) e grandes com raízes (%ECGR). Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Causas de Variação	GL	NEC	Características Avaliadas					
			%ECP	%ECM	%ECG	%ECPR	%ECMR	%ECGR
Meio	1	771,0ns	1187**	375**	312**	547ns	44,6ns	473,2ns
Erro	20	4298,5	128,9	49,3	83,1	723,4	176,2	392,6
C.V. (%)		12,80	32,24	16,91	42,09	56,43	14,75	21,12

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Não houve efeito significativo dos meios de cultura para o número de embriões germinados por biorreator, a 5% de probabilidade, indicando que, para as condições estudadas, os meios de cultura utilizados no biorreator do tipo Rita® não afetaram a conversão de embriões globulares para embriões cotiledonares (Tabela 6). Houve 100% de germinação dos embriões, indicando a eficiência do sistema de cultivo de embriões somáticos de *C. arabica* em larga escala em biorreator de imersão temporária tipo RITA®, possibilitando a automação do processo de micropropagação e reduzindo consideravelmente o trabalho (Figura 3).





Figura 3 Micropropagação do cafeeiro por biorreator de imersão temporária tipo “RITA®”. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma desuniformidade em relação ao desenvolvimento dos embriões cotiledonares, sendo que estes foram classificados em pequenos (0,50-1,50cm), médios (1,51-2,50cm) e grandes (2,51-5,0cm) como pode-se observar na Tabela 7. Justificando essa desuniformidade morfológica, pode-se citar uma provável concorrência por luminosidade devido ao elevado número de embriões cotiledonares utilizados em cada biorreator,  $500 \pm 50$ .

Barry-Etienne et al. (2002) também utilizando o biorreator de imersão temporária - RITA®, obtiveram, após dois meses de cultivo, 86% de germinação dos embriões somáticos, porém com características anatômicas heterogêneas. Igualmente, para *C. canephora*, a germinação de embriões somáticos produzidos em placas de Petri também mostrou heterogeneidade no desenvolvimento da cultura (DUCOS et al., 2008).

Os tratamentos que proporcionaram a maior porcentagem de embriões cotiledonares pequenos (0,50-1,50cm) foram T5A1 (0,25mg.L<sup>-1</sup> de BAP) e T5A2 (0,25mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25mg.L<sup>-1</sup> de AIA), pode ser observado na Tabela

7. Embriões cotiledonares pequenos, ou seja, com comprimento inferior a 1,5cm, geralmente apresentam baixa porcentagem de conversão em plântulas durante o processo de aclimatização (BARRY-ETIENNE et al., 2002).

Os tratamentos que proporcionaram a maior porcentagem de plântulas médias (1,51-2,50cm) foram T5A (2,0mg.L<sup>-1</sup> de BAP), T5A3 (0,25mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,50mg.L<sup>-1</sup> de AIA) e T5A4 (0,50mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,50mg.L<sup>-1</sup> de AIA).

Tabela 7 Valores médios para as características número de embriões cotiledonares (NEC), % de embriões cotiledonares pequenos (%PP), % de embriões cotiledonares médios (%PM), % de embriões cotiledonares grandes (%PG), % de embriões cotiledonares pequenos com raízes (%PPR), % de embriões cotiledonares médios com raízes (%PMR) e % de embriões cotiledonares grandes com raízes (%PGR) em deferentes meios de cultura. Fundação Procafé, Varginha, MG, 2011

Meio de Cultura	Características Avaliadas						
	NEC	%ECP	%ECM	%ECG	%ECPR	%ECMR	%ECGR
T5A	522,8ns	15,83c	49,00a	34,33 <sup>a</sup>	45,50ns	90,33ns	90,83ns
T5A1	511,3	53,4a	31,00b	17,16b	35,30	90,16	79,50
T5A2	506,8	44,67a	35,67b	19,83b	43,67	91,16	100,0
T5A3	496,8	34,50b	43,83a	20,00b	53,67	92,83	98,83
T5A4	523,8	34,34b	48,16a	17,00b	60,16	85,50	100,0

As médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade e pertencem ao mesmo grupo pelo Teste de Scott-Knott.

ns: não significativo

A utilização da citocinina BAP na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup> adicionado ao meio de cultura promoveu a maior porcentagem de plântulas grandes (2,5-5,0cm).

As citocininas atuam na divisão celular, sendo necessárias na regulação da síntese de proteínas que estão diretamente relacionadas com a formação de fibras do fuso mitótico, uma das principais citocininas utilizadas é a 6-benzilaminopurina - BAP (GEORGE, 1993).

O escalonamento do processo de micropropagação pode ser útil, desde que uma produção muito eficiente de embriões seja atingida para *C. arabica*.

Além disso, foi demonstrado que embriões pré-germinados de café, isto é, com alongamento do eixo embrionário (10-12 mm), formação de ponta de radícula, expansão do cotilédone e esverdeamento obtidos em biorreatores de imersão temporária fotoautotrófico são capazes de regenerar plântulas vigorosas depois de semeados em viveiro (ETIENNE et al., 2006). O protocolo usado no presente trabalho mostrou alta eficiência na produção de embriões cotiledonares com 1,5cm em biorreatores de imersão temporária, indicando que o mesmo pode ser usado para produção de clones de *C. arabica* em larga escala.

Harris e Mason (1983) afirmam que o maior volume do frasco proporciona a utilização de maior quantidade de meio de cultura, prevenindo deficiências de certos constituintes do meio. Para Etienne e Berthouly (2002), maior volume de meio pode ter efeito positivo na proliferação e no crescimento de plântulas *in vitro*.

Não houve significância para as características: embriões cotiledonares pequenos, médios e grandes com raízes (Tabela 7). Porém, observou-se elevado percentual de enraizamento em todos os tratamentos, independente do tamanho do embrião cotiledonar.

#### 4 CONCLUSÕES

- a) O meio de cultura “MM” proporciona a maior taxa de multiplicação de calos embriogênicos que o meio “T3”.
- b) A coloração do calo não interfere na sua taxa de multiplicação.
- c) O aumento das concentrações de ácido naftaleno acético de 0,0 a 2,0 mg.L<sup>-1</sup> promove um aumento linear na formação de embriões somáticos.
- d) A regeneração de embriões globulares é diretamente proporcional à concentração do aminoácido prolina, na faixa de 0,0 a 4 g.L<sup>-1</sup>.
- e) O emprego de biorreator de imersão temporária tipo RITA® é eficiente no processo de maturação de embriões somáticos.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. M. C. et al. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, set./out. 2001.
- BARRY-ETIENNE, D. et al. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nurse. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, p. 153-162, 2002.
- BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, p. 4-17, 1996.
- CARVALHO, C. H. S. et al. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro 'Catuaí Vermelho' propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 378-383, 2011.
- DUCOS, J. P. et al. Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. **Phytochemistry Reviews**, New York, v. 7, p. 607-613, 2008.
- DUCOS, J. P.; LAMBOT, C.; PETIARD, V. Bioreactors for coffee propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of Plant Developmental Biology**, Ikenobe, n. 1, v. 1, p. 1-12, 2007.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 215-231, June 2002.
- ETIENNE, H. et al. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goitacazes, v. 18, n. 1, p. 45-54, 2006.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. In: \_\_\_\_\_. **The technology**. 2nd ed. Edington: Exegetis, 1993. 574 p. Part. 1.
- HARRIS, R. E.; MASON, E. B. Two machines for in vitro propagation plants in liquid media. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 63, n. 1, p. 311-316, 1983.

LOYOLA-VARGAS, V. M. et al. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings...** Helsinki: ASIC, 1999. p. 302-307.

LUIS, Z. G. **Propagação in vitro e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonina basiloba* Juss., *Malpighiaceae*)**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MACIEL, A. L. R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.

MERKLE, S.; PARROTT, W.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 155-203.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, A. R. et al. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, 2007.

PILET, P. E.; SAUGY, M. Effect on root of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, Campos dos Goitacazes, v. 83, p. 33-38, 1987.

REZENDE, J. C. et al. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas de embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p.

TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C. E. Development of an automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 5, p. 107-117, 1985.

ZAMARRIPA, A. et al. Productio d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café, Cacao e Thé**, Paris, v. 35, n. 4, p. 233-244, 1991.

**CAPÍTULO 3 Aclimatização de somaclones de cafeeiro obtidos em  
biorreator de imersão temporária tipo Rita®**

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar eficiência da aclimatização de somaclones de cafeeiro micropropagados por embriogênese somática via biorreator. Nessa etapa foram realizados 3 experimentos. Os experimentos 1 e 2 foram instalados em casa de vegetação do Setor de Cafeicultura DAG/UFLA, Lavras, MG. Foram utilizados embriões cotiledonares da matriz 05 da população de Siriema, desenvolvidos em biorreatores tipo RITA®. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4X3 (4 substratos e 3 tamanhos de embriões cotiledonares) com 4 repetições, constituída de 25 plântulas. Os substratos utilizados foram: fibra de coco; 2/3 de fibra de coco + 1/3 de areia; plantmax florestal® e 2/3 plantmax florestal® + 1/3 de areia. Os embriões cotiledonares foram classificados em 3 tamanhos: pequenos (0,50 a 1,50cm); médios (1,51 a 2,50cm) e grandes (2,51-5,00cm). Aos 60 dias, o experimento foi avaliado por meio da porcentagem de conversão dos embriões cotiledonares em plântulas. Experimento 2: o delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4x5 com 4 repetições, constituída de 25 embriões cotiledonares. Os substratos utilizados foram: fibra de coco; 2/3 de fibra de coco + 1/3 de vermiculita; plantmax florestal® e 2/3 plantmax florestal® + 1/3 de vermiculita. As concentrações de stimulate® utilizadas foram: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mL.L<sup>-1</sup>. Aos 60 dias, o experimento foi avaliado por meio da porcentagem de conversão dos embriões cotiledonares. Experimento 3: o experimento foi instalado e conduzido em viveiro comercial com 50% de sombreamento no município de Muzambinho, MG. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2X5 (2 substratos e 5 concentrações de osmocote®) com 4 repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 5 plantas. Os substratos utilizados foram: plantmax florestal® e 2/3 plantmax florestal® + 1/3 de vermiculita. As concentrações de osmocote® utilizadas foram correspondentes a: 0, 2,72, 5,45, 8,18 e 10,9 g.L<sup>-1</sup> de substrato comercial. O maior percentual de conversão é obtido utilizando embriões cotiledonares médios em plantmax®, o substrato composto por plantmax® e vermiculita apresenta maior porcentagem de conversão em concentrações crescentes de stimulate® e o osmocote® na concentração entre 10,9g.L<sup>-1</sup> de substrato proporciona melhor qualidade de mudas.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Fertilização. Fitorregulador. Substratos.

## ABSTRACT

The acclimatization of micropropagated plantlets of these is the removal of culture medium *in vitro* for another type of substrate and environment. This process represents an important step in a program that works with the production of coffee seedlings through somatic embryogenesis by temporary immersion bioreactor. The objective of this study was to evaluate the efficiency of acclimatization of micropropagated seedlings of coffee through somatic embryogenesis bioreactor. Experiments 1 and 2 were installed in the greenhouse at the Polo de Excelência em Cafeicultura da UFLA, Lavras, MG. The seedlings used were derived from somatic embryos of Clone 05 *C. arabica* L. cv. Siriema developed in RITA® bioreactor. The experimental design was completely randomized in factorial 4X3 with 4 replicates of 25 seedlings. The substrates used were: S1: Coconut fiber; S2: 2/3 Fiber coconut + 1/3 sand, S3: Plantmax Forest® and S4: 2/3 Forest Plantmax® + 1/3 sand. Plantlets of different sizes were used: P1: small plantlets (0.5 to 1.5 cm), P2: plantlets medium (1.5 to 2.5 cm) and P3: large plantlets (2.5-5.0 cm). At 60 days, the experiment was evaluated by the percentage of fixation of seedlings. Experiment 2: The experimental design was completely randomized in factorial arrangement with four replicates of 25 seedlings. The substrates used were: S1: Coconut fiber; S2: 2/3 Fiber coconut + 1/3 vermiculite, S3: Forestry Plantmax® and S4: 2/3 Plantmax Forestry® + 1/3 vermiculite. Stimulate® concentrations used were: ST1: 0.0 mL<sup>-1</sup>, ST2: 0.5 mL<sup>-1</sup>, ST3: 1.0 mL<sup>-1</sup>; ST4: 1.5 mL<sup>-1</sup> and ST5: 2.0 mL<sup>-1</sup>. At 60 days, the experiment was evaluated by the percentage of fixation of seedlings. Experiment 3: The experiment was conducted in the nursery trade and 50% shading in Muzambinho - MG. The experimental design was completely randomized in factorial 2X5 with 4 replications, each experimental unit consisted of five plants. The substrates used were: S1: Forestry Plantmax® and S2: 2/3 Forestry Plantmax® + 1/3 vermiculite. Osmocote® concentrations used were equivalent to 0, 150, 300, 450 and 600g of fertilizer.55 L<sup>-1</sup> of commercial substrate. The highest percentage of plantlets set is obtained using medium plantlets in Plantmax. The substrate composed of vermiculite and Plantmax higher percentage of plantlets set in increasing concentrations of Osmocote® between 450 - 600g.55L substrate<sup>-1</sup> and Stimulate® provides better seedling quality.

Keywords: Biostimulant. *Coffea arabica* L. Fertilization. Substrate.

## 1 INTRODUÇÃO

A aclimatização de plântulas micropropagadas consiste na retirada dessas do meio de cultivo *in vitro* para outro tipo de substrato e ambiente, com o objetivo de promover uma adaptação gradativa (MOREIRA et al., 2006). Esse processo representa uma importante etapa dentro de um programa que trabalha com produção de mudas de cafeeiro por embiogênese somática em biorreator de imersão temporária.

Um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (HAZARIKA, 2003). A maioria das espécies cultivadas *in vitro* requer processo de aclimatização, envolvendo modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente (CARVALHO et al., 1999; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A otimização do processo de aclimatização envolve suprimento de nutrientes, uso de substratos adequados, utilização de reguladores de crescimento, controle do ambiente de cultivo, entre outros (CATUNDA, 2004).

Um substrato ideal é aquele que satisfaz as exigências químicas e físicas das mudas, fornecendo um teor adequado de nutrientes ao seu desenvolvimento. Deve apresentar composição uniforme, baixa densidade, grande porosidade, alta capacidade de troca de cátions, boa retenção de água, isenção de pragas, patógenos e sementes, ser abundante, operacionalizável e economicamente viável. Vários materiais têm sido usados na produção de mudas em tubetes, isoladamente ou em misturas, destacando-se: vermiculita, esterco bovino, “moinha” de carvão, serragem, bagaço de cana, acícula e casca de pínus, casca de eucalipto compostada, casca de arroz carbonizada, húmus de minhoca e turfa

(CAMPINHOS JUNIOR; IKEMORE; MARTINS, 1984; GUIMARÃES et al., 1998).

A mistura de dois ou mais reguladores vegetais e outras substâncias (aminoácidos, nutrientes, vitaminas), é designada de fitorregulador ou estimulante vegetal, como por exemplo, o stimulate®. A classificação do stimulate® foi feita por Castro, Pacheco e Medina (1998) como sendo um fitoestimulante que contém fitorreguladores e traços de sais minerais, estando presentes: 0,009% de cinetina (citocinina), 0,005% de ácido giberélico (giberelina), 0,005% de ácido indolbutírico (auxina) e 99,981% de ingredientes inertes. É uma substância líquida, não viscosa, de coloração castanha, solúvel em água e de fácil absorção por sementes, raízes, ramos, folhas e frutos. Esse produto químico pode, em função da sua composição, concentração e proporção das substâncias, incrementar o crescimento e desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, diferenciação e o alongamento das células, favorecer o equilíbrio hormonal da planta, podendo também aumentar a absorção e a utilização de água e dos nutrientes pelas plantas (VIEIRA; CASTRO, 2004).

A demanda de nutrientes pela planta depende da sua taxa de crescimento e da sua eficiência em converter em biomassa os nutrientes absorvidos. Assim, podem ocorrer diferenças na eficiência nutricional entre cultivares, sendo importante a definição do substrato e a forma de adubação mais adequada a ser utilizada na fase de aclimação de mudas de determinado genótipo, para reduzir perdas e assegurar boa adaptação e crescimento após o plantio no campo (NOMURA et al., 2008).

A complementação do substrato com nutrientes para mudas em tubetes geralmente é feita com adubos de liberação lenta, visando reduzir problemas de excesso de solubilidade e perdas por lixiviação de nutrientes. Osmocote®,

Nutricote® e ureia revestida com enxofre são alguns exemplos desse tipo de fertilizante (LANDIS et al., 1989).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do processo de aclimatização de somaclones de cafeeiro micropropagadas por embriogênese somática em biorreator de imersão temporária tipo RITA®.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aclimatização**

Foram realizados dois experimentos durante a etapa de aclimatização dos embriões cotiledonares.

#### **2.1.1 Caracterização geral dos experimentos**

Os experimentos foram instalados e conduzidos em casa de vegetação do Setor de Cafeicultura do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, no período de agosto a outubro de 2010. O município de Lavras localiza-se a uma altitude média de 910 metros, latitude de 21°14'06"S e longitude de 45°00'00"W.

Os recipientes utilizados para instalação dos experimentos foram bandejas de polietileno de 128 células, em que foram utilizadas apenas 100.

Após serem produzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Fundação Procafé, em Varginha, Minas Gerais; os embriões cotiledonares foram transferidos para a casa de vegetação com aproximadamente 90% de umidade relativa do ar, temperatura média próxima de 25°C, sistema de nebulização automático e 50% de luminosidade.

#### **2.1.2 Material vegetal**

Os embriões cotiledonares utilizados no experimento foram provenientes de embriões somáticos da planta matriz 05 da população Siriema (*Coffea racemosa* x *Coffea arabica*), desenvolvidos em biorreatores de imersão temporária tipo RITA®.

### **2.1.3 Experimento 1: substratos e tamanho dos embriões cotiledonares**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4X3 (quatro substratos e três tamanhos de embriões cotiledonares) com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 25 embriões cotiledonares.

Os substratos utilizados no experimento foram: fibra de coco (FC); 2/3 de fibra de coco + 1/3 de areia lavada e peneirada (2/3FC+1/3A); plantmax florestal® (P) e 2/3 plantmax florestal® + 1/3 de areia lavada e peneirada (2/3P+1/3A). Os embriões cotiledonares foram classificados em três tamanhos: embriões cotiledonares pequenos (0,50 a 1,50cm); embriões cotiledonares médios (1,51 a 2,50cm) e embriões cotiledonares grandes (2,51-5,00cm).

### **2.1.4 Experimento 2: substratos e fitorregulador stimulate®**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4X5 (quatro substratos e cinco concentrações do fitorregulador stimulate®) com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 25 embriões cotiledonares.

Os substratos utilizados no experimento foram: fibra de coco (FC); 2/3 de fibra de coco + 1/3 de vermiculita (2/3FC + 1/3V); plantmax florestal® (P) e 2/3plantmax florestal® + 1/3 de vermiculita (2/3P + 1/3V). As concentrações do fitorregulador stimulate® utilizadas foram: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mL.L<sup>-1</sup>.

As aplicações de stimulate® foram realizadas com pulverizador manual com capacidade para 500mL. As pulverizações foram feitas logo após a transferência dos embriões cotiledonares para o substrato e a cada 20 dias, totalizando quatro aplicações durante o período experimental.

As irrigações foram realizadas por meio de microaspersores, mantendo a umidade relativa do ar em  $85 \pm 5\%$ .

### **2.1.5 Avaliações e análises estatísticas**

Aos 60 dias, os experimentos foram avaliados por meio da porcentagem de conversão dos embriões cotiledonares em plântulas, quando os mesmos atingiram 2 pares de folhas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias foram analisadas pelo teste de agrupamento de médias Skott Knott.

## **2.2 Experimento 3: crescimento de plântulas em diferentes substratos e concentrações de fertilizante de liberação lenta**

O experimento foi instalado e conduzido em viveiro comercial com 50% de sombreamento obtido com tela tipo “sombrite”, localizado no sítio São Domingos no município de Muzambinho, Minas Gerais, com altitude de 1033 metros, Latitude de  $20^{\circ}18'00''S$  e Longitude de  $46^{\circ}30'00''W$ ; no período de outubro de 2010 a abril de 2011.

As plântulas de cafeeiro utilizadas no experimento foram obtidas por meio de embriões cotiledonares aclimatizados em casa de vegetação por um período de 60 dias. Os recipientes utilizados durante a fase de aclimatização foram bandejas de polietileno de 128 células e o substrato utilizado foi plantmax florestal®.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial  $2 \times 5$  (dois substratos e cinco concentrações de fertilizante de liberação lenta) com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco plantas.

Os substratos utilizados no experimento foram: plantmax florestal® (P) e 2/3plantmax florestal ® + 1/3 de vermiculita (2/3P+1/3V). As concentrações do fertilizante de liberação lenta (osmocote®) utilizadas foram correspondentes a: 0,0; 2,72; 5,45; 8,18 e 10,90g de osmocote®.L<sup>-1</sup> de substrato, o que corresponde: a 0, 150, 300, 450 e 600g do fertilizante por saca de 55 L<sup>-1</sup> de substrato comercial. Foi utilizada a formulação do fertilizante de liberação lenta 15-10-10 + micronutrientes, apresentando 15,0% de N, 10,0% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10,0% de K<sub>2</sub>O, 3,5% de Ca, 1,5% de Mg, 3,0% de S, 0,02% de B, 0,05% de Cu, 0,5% de Fe, 0,1% de Mn, 0,004% de Mo e 0,05% de Zn.

Como recipientes foram utilizados tubetes de polietileno preto, de forma cônica, com 8 estrias longitudinais internamente, perfurados na extremidade inferior e com capacidade volumétrica de 120mL, previamente esterilizados com hipoclorito de sódio a 0,4%. Os tubetes foram colocados em suporte confeccionados com arame de 3,5mm de diâmetro, com malha quadrática de 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>" e largura de 1,20m. A tela foi montada a 1m de altura da superfície do solo utilizando-se uma estrutura de ferro construída sobre moirões de eucalipto para acondicionamento dos tubetes.

As irrigações foram realizadas por meio de microaspersão, duas vezes ao dia, procurando evitar deficiências hídricas.

As avaliações foram realizadas aos 180 dias após a instalação do experimento, quando as mudas estavam no estágio de plantio no campo (média de quatro pares de folhas). Foram avaliadas as características: altura de plantas (AP, cm), diâmetro de caule na altura do colo (DC, cm), número de pares de folhas (NPF), área foliar (AF, cm<sup>2</sup>), massa fresca de raízes (MFR, g) e parte aérea (MFPA, g), massa seca de raízes (MSR, g) e parte aérea (MSPA, g) e teores de nutrientes presentes nas folhas.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância para verificação de diferenças significativas entre si. Os dados obtidos foram

submetidos à análise estatística, com aplicação do teste de F ao nível de 5% de probabilidade, e as médias foram analisadas pelo teste de agrupamento de médias Skott Knott e por regressão polinomial.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Aclimatização

A aclimatização foi realizada por duas etapas e os resultados obtidos durante esse processo estão representados a seguir.

##### 3.1.1 Experimento 1: substratos e tamanho dos embriões cotiledonares

A interação entre os substratos e o tamanho dos embriões cotiledonares foi significativa para a característica analisada, ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 1 Análise de variância para a característica porcentagem de conversão de embriões cotiledonares em plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio
		Porcentagem de Conversão
Substrato	3	3384,16**
Embriões Cotiledonares	2	3021,27**
Substrato * Embriões	3	430,68 **
Erro	36	36,45
C.V. (%)	16,5	

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

A maior conversão de embriões cotiledonares em plântulas foi obtida utilizando-se o substrato plantmax florestal® associado com embriões cotiledonares de tamanho médio (1,50 – 2,51cm) como pode ser observado na Tabela 2.

Esses resultados se assemelham com aqueles obtidos por Barry-Etienne et al. (2002), que ao avaliar substratos e tamanhos de embriões cotiledonares, concluíram que a maior porcentagem de conversão foi obtida utilizando-se embriões entre 1,5 e 5,0cm em plantmax horticultura®, apresentando estas, um elevado vigor e maior acúmulo de matéria fresca. Os mesmos autores estudando

os tipos morfológicos de embriões somáticos com cotilédones considerados pequenos e médios, que foram mais representativos no biorretator, observaram uma conversão de embriões cotiledonares em plântulas de 47 a 63% respectivamente.

Tabela 2 Conversão de embriões cotiledonares em plântulas (%) de cafeeiros de diferentes tamanhos em substratos distintos. UFLA, Lavras, MG, 2011

Tamanho de Embriões Cotiledonares	Conversão de Embriões Cotiledonares em Plântulas			
	Substratos			
	FC	$^{2/3}FC+^{1/3}A$	P	$^{2/3}P+^{1/3}A$
Pequenos	16,00Ca	14,25Dc	31,25Bc	37,25Ab
Médios	20,25Da	37,75Ca	78,00Aa	70,50Ba
Grandes	18,25Da	28,50Cb	51,00Ab	36,00Bb

Nos substratos, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha horizontal e em cada tamanho de plântula, médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha vertical, pertencem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott.

Os embriões cotiledonares de tamanho pequeno (0,50 – 1,50cm) apresentaram baixa taxa de conversão (16,0 a 32,25%), dificultando o processo de aclimatização, no entanto, plântulas grandes (2,51 – 5,00cm) também apresentaram uma porcentagem de conversão inferior ao esperado, possivelmente, devido ao estiolamento das mesmas, apresentando estas, menor diâmetro de caule e maior altura.

Os substratos à base de fibra de coco apresentaram uma porcentagem de conversão inferior quando comparado ao substrato comercial plantmax florestal®, como pode ser observado na Tabela 2.

### 3.1.2 Experimento 2: substratos e fitorregulador stimulate®

Houve efeito significativo para substrato, stimulate® e para interação substrato e stimulate® ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 3).

Tabela 3 Análise de variância para a característica porcentagem de pegamento.  
UFLA, Lavras, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio
		Porcentagem de Pegamento
Substrato	3	7766,93**
Embriões Cotiledonares	4	134,075**
Substrato * Stimulate®	12	33,8500**
Erro	60	2,44166
C.V. (%)	3,90	

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Analisando as curvas de regressão (Figura 1), observa-se que houve uma tendência linear no comportamento dos substratos em relação às concentrações do fitorregulador stimulate®. Contudo, os melhores resultados foram obtidos com a combinação entre o substrato composto por 2/3 de plantmax florestal® e 1/3 de vermiculita e concentrações crescentes de stimulate®.

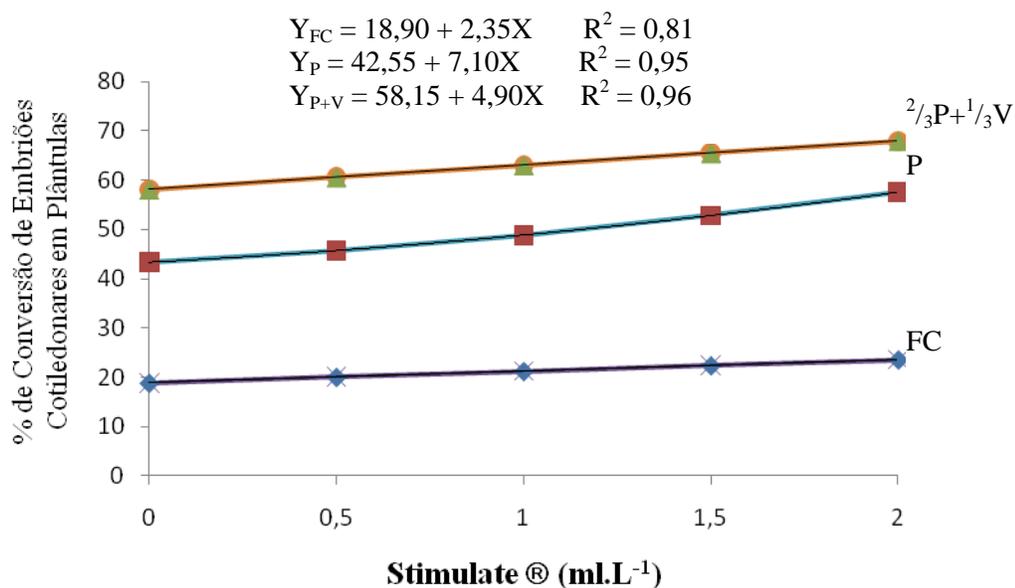


Figura 1 Porcentagem de pegamento de embriões cotiledonares em diferentes substratos e concentrações do fitorregulador stimulate®. UFLA, Lavras, MG, 2011

Esses dados confirmam os resultados obtidos na aplicação de fitorreguladores como técnica agrônômica para se otimizar a produção de mudas em diversas culturas, em especial ao cafeeiro (CASTRO; PACHECO; MEDINA, 1998).

O uso de reguladores vegetais na aclimatização de plântulas de cafeeiro ainda não é uma prática rotineira, apesar desta já ter atingido um alto nível tecnológico. Todavia, segundo Santos (2004) sabe-se que a utilização dessas substâncias interfere no crescimento das plantas, possibilitando uma relação mais equilibrada entre a parte aérea e sistema radicular.

### 3.2 Experimento 3: crescimento de mudas em diferentes substratos e concentrações de fertilizante de liberação lenta

Houve efeitos significativos dos substratos para área foliar e diâmetro de caule. As doses de osmocote® influenciaram todas as características avaliadas, mostrando-se altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 4). Enquanto para a interação entre os substratos e as doses de osmocote®, o efeito foi significativo apenas para as características altura de plantas e área foliar (Tabela 4).

Tabela 4 Análise de variância para as características: número de folhas verdadeiras (NFV), altura de plantas (cm), área foliar (AF, cm<sup>2</sup>) e diâmetro de caule (DC, mm). Muzambinho, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio			
		NFV	Altura	AF	DC
Osmocote	4	4,8265**	71,197**	6999,54**	1,63344**
Substrato	1	0,4515ns	0,0081ns	302,885**	0,01936*
Osm.*Sub	4	0,3062ns	0,3336**	94,1974**	0,00551ns
Erro	30	3,6093	0,0305	11,2039	0,00368
C.V. (%)		6,40	1,38	3,58	2,06

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

O maior número de folhas verdadeiras foi obtido utilizando as concentrações de osmocote® entre 5,45 e 8,18 g.L<sup>-1</sup>, como pode ser observado na Figura 2 sem que houvesse interferência dos substratos. Como o número de pares de folhas verdadeiras reflete o desenvolvimento da planta, as doses do fertilizante de liberação lenta entre 5,45 e 8,18 g.L<sup>-1</sup>, pode representar melhores respostas em relação ao desenvolvimento das mudas de cafeeiro.

Melo, Mendes e Guimarães (1999) verificaram que o melhor desenvolvimento das mudas de cafeeiro oriundas de propagação reprodutiva foi obtido com a aplicação de 450g do fertilizante osmocote® (15-10-10 + micronutrientes) em 55 litros do substrato comercial plantmax®, o que corresponde à concentração de 8,18 g.L<sup>-1</sup>.

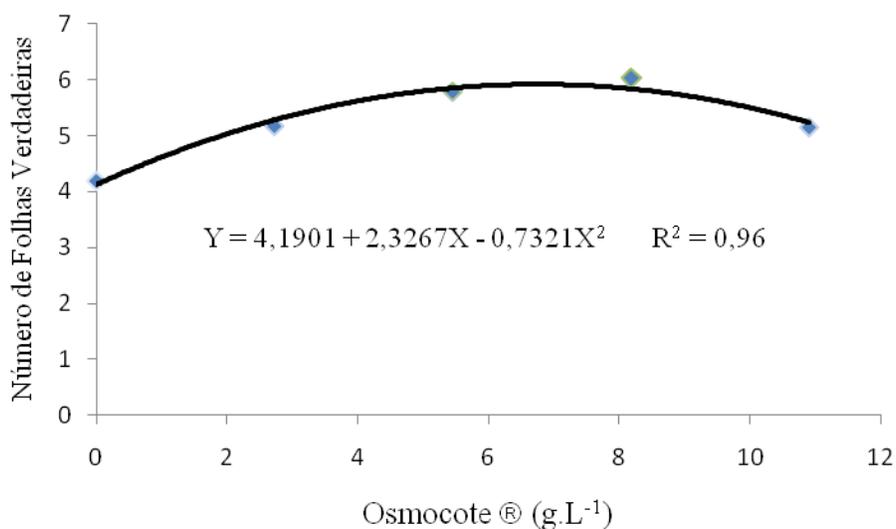


Figura 2 Número de folhas verdadeiras em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Para a altura de plantas observou-se uma resposta quadrática às concentrações de osmocote® (Figura 3), havendo uma interação significativa para os substratos. O maior crescimento em altura das mudas cultivadas foi

obtido com o incremento de fertilizante de liberação lenta junto aos substratos nas dosagens de 8,18g de osmocote.L<sup>-1</sup> de substrato. De acordo com a figura 3, observa-se que, na dose zero de fertilizante de liberação lenta, a altura das mudas apresenta os menores valores. Isso comprova que os substratos usados não fornecem os nutrientes necessários ao adequado desenvolvimento das plantas.

Costa, Gonçalves e Guerreiro Filho (2000) avaliando várias misturas e substratos na produção de mudas, via sementes de Icatu Amarelo, observaram que as plantas cultivadas com substrato plantmax® 100%, acrescido de 16,67g de osmocote.L<sup>-1</sup> de substrato, apresentaram o maior altura e nutrição equilibrada.

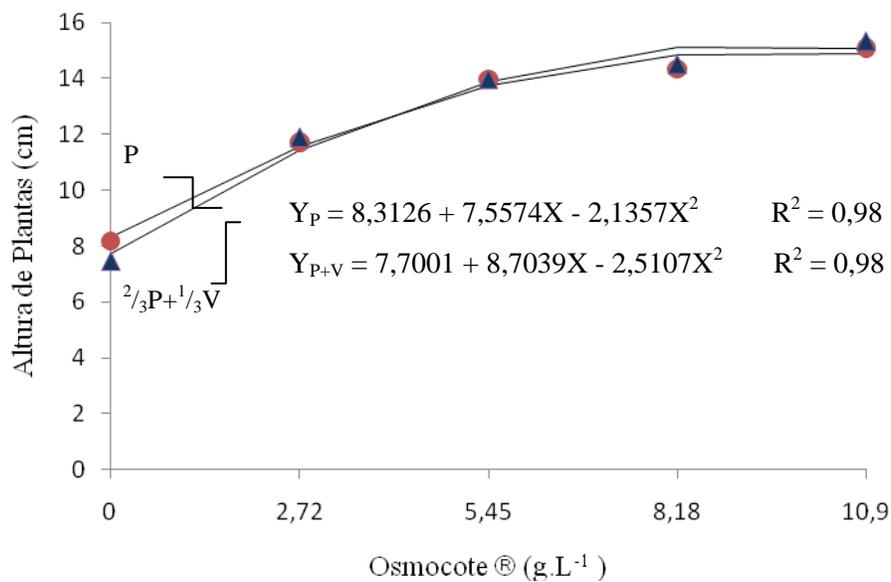


Figura 3 Altura de plantas (cm) de cafeeiro cultivados em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Na Figura 4 pode-se observar uma interação entre os substratos e as concentrações de osmocote® para a área foliar de plantas de cafeeiro. A menor

área foliar foi obtida em ambos os substratos em plantas cultivadas sem adição de fertilizante de liberação lenta (Figura 4).

Marcuzzo et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar mudas de cafeeiros produzidas por sementes em tubetes; os mesmos observaram resposta linear nas concentrações de fertilizantes de liberação lenta, ou seja, acima de 10,9g de Osmocote.L<sup>-1</sup> de substrato.

Mudas micropropagadas com maior área foliar na época de serem transplantadas para o campo apresentam crescimento inicial mais rápido, em virtude da maior produção de fotoassimilados e posterior alocação para outros órgãos da planta (drenos). Contudo, considera-se também a matéria seca da parte aérea uma boa indicadora da capacidade de resistência das mudas às condições adversas após o plantio no campo (LIMA et al., 2009).

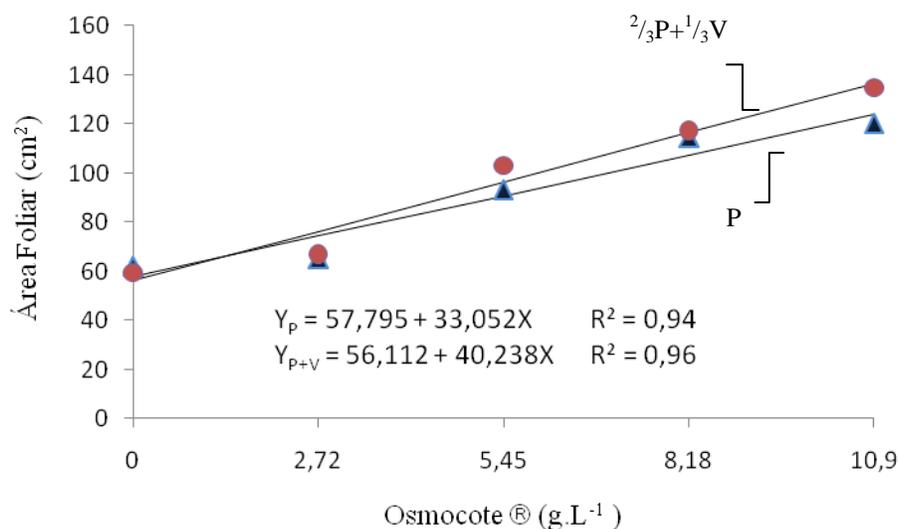


Figura 4 Área foliar (cm<sup>2</sup>) em plantas de café cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Para o diâmetro de caule houve efeito significativo dos substratos e do osmocote®. Para essa característica a melhor dose do fertilizante de liberação

lenta está entre 8,18 e 10,9g.L<sup>-1</sup> adicionado ao substrato composto por plantmax® e vermiculita (Figuras 5 e 6).

O diâmetro de caule pode indicar o estiolamento das mudas de cafeeiros micropropagadas. O intervalo de 8,18 e 10,9g.L<sup>-1</sup> pode estar nas concentrações ideais, pois acima desses valores podem ocorrer caules com diâmetros menores que os aceitáveis para o padrão de mudas, evidenciando dessa maneira o estiolamento das mesmas, o que conseqüentemente promoverá um baixo pegamento de plantas em condições de campo.

Barbizan et al. (2002) avaliando a influência do osmocote® no desenvolvimento de mudas de cafeeiros por sementes em tubetes, observaram que o diâmetro do caule aumentou com a aplicação do fertilizante de liberação lenta até um máximo de 3,46mm, que correspondeu à concentração de 7,7g de osmocote.L<sup>-1</sup>, resultados estes, semelhantes aos obtidos no presente experimento.

Os substratos comerciais à base de casca de pinus afetam significativamente o diâmetro do caule de mudas de cafeeiro (LANA et al., 2002). A casca de pinus é material muito utilizado na composição dos substratos comerciais, por ser praticamente matéria orgânica, sua decomposição vai ocorrendo à medida que é utilizada (LANA et al., 2002). Suas principais características são a baixa densidade, facilidade de drenagem e granulometria variável. Essa composição permite observar que a casca de pinus e a vermiculita conferem uma textura mais grosseira ao substrato, reduzindo o nível de compactação e aumentando a drenagem interna e aeração do sistema radicular. A vermiculita tem a função principal de aumentar a absorção de água, dessa forma, há um equilíbrio entre a aeração e o armazenamento de água que favorece o desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, o diâmetro de caule das mudas de cafeeiro (LANA et al., 2002).

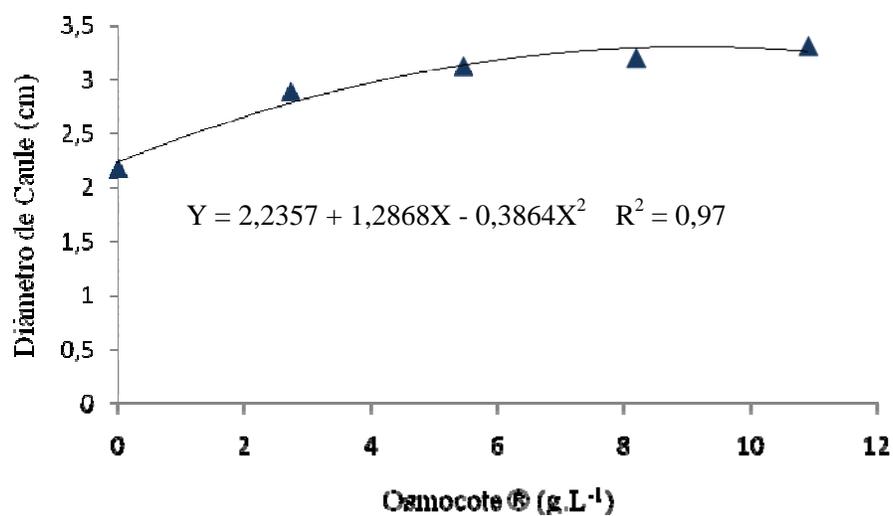


Figura 5 Diâmetro de caule (mm) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

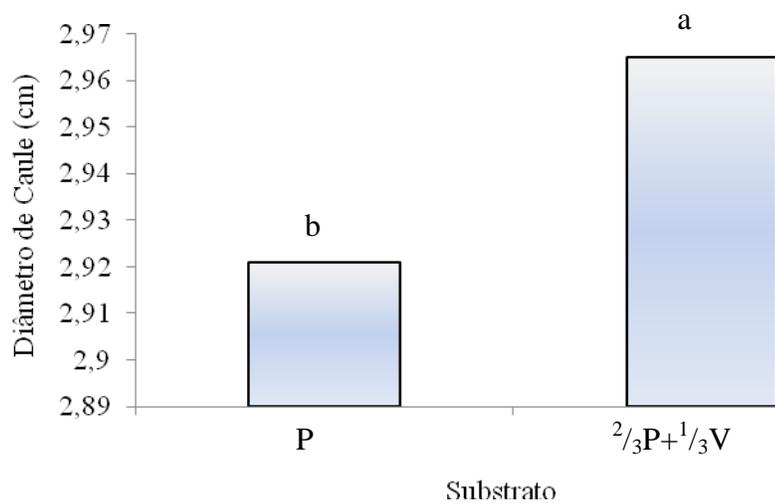


Figura 6 Diâmetro de caule (mm) de plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011

Houve efeitos significativos dos substratos para massa seca da parte aérea e para massas secas e frescas do sistema radicular (Tabela 5). As concentrações de osmocote® influenciaram todas as características avaliadas, mostrando-se altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade. Enquanto para a interação entre os substratos e as concentrações de osmocote®, o efeito foi não significativo para todas as características avaliadas.

Tabela 5 Análise de variância para as características massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR) e massa seca do sistema radicular (MSSR). Muzambinho, MG. 2001

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio			
		MFPA	MSPA	MFSR	MSSR
Osmocote	4	4,9357**	0,72040**	0,04860**	0,07639**
Substrato	1	0,0756ns	0,01681*	0,00272**	0,00306**
Osm.*Sub	4	0,0448ns	0,00542ns	0,00029ns	0,00041ns
Erro	30	0,0252	0,00234	0,00019	0,00029
C.V. (%)		3,76	2,98	3,02	0,32

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

As massas fresca e seca da parte aérea foram influenciadas pelas doses de osmocote® junto aos substratos. Observou-se para essa característica uma resposta linear das concentrações do fertilizante de liberação lenta.

Analisando o comportamento das Figuras 3, 5, 6, 7, 8 e 9, nota-se, que foram alcançados pontos de máximo crescimento correspondentes à dose de 10,9g.L<sup>-1</sup> de osmocote®, para altura de plantas, diâmetro de caule e massas frescas e secas da parte aérea, podendo ser sugerido, inclusive, a adição de concentrações superiores. Porém, deve-se levar em consideração que, concentrações elevadas de osmocote® podem promover o estiolamento das mudas e futuros problemas no momento da implantação da lavoura cafeeira.

Marana et al. (2008) analisando o comportamento de mudas de cafeeiros produzidos em tubetes, observaram que foram alcançados pontos de máximo

crescimento correspondentes às doses de adubo de liberação lenta variando entre 13,31 para o diâmetro de caule e 15,28 g.L<sup>-1</sup> de substrato para a matéria seca da parte aérea.

Lana et al. (2002) demonstram, em seus resultados, o efeito positivo da utilização conjunta de substratos comerciais com fertilizantes de liberação lenta, provavelmente pela combinação das características dos substratos que favorecem o maior crescimento das mudas de cafeeiros, associada com a liberação gradual e contínua dos nutrientes pelo adubo para as plantas.

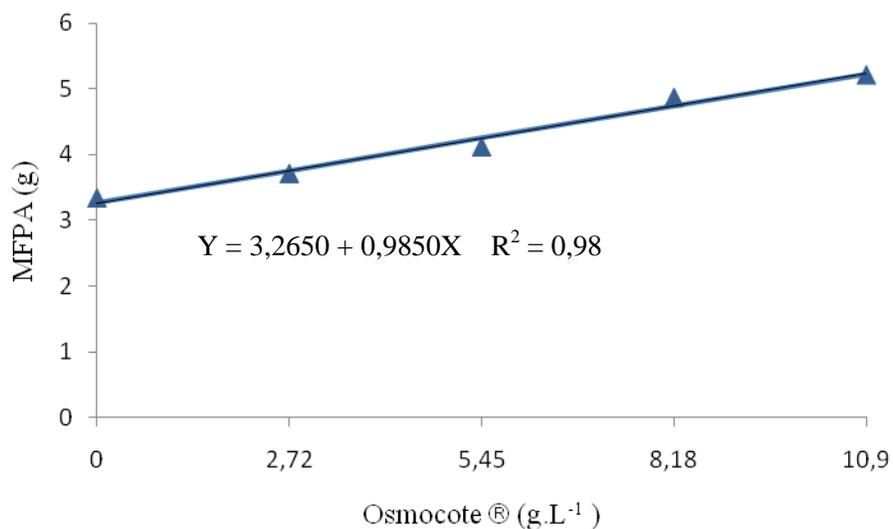


Figura 7 Massa fresca da parte aérea (MFPA) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

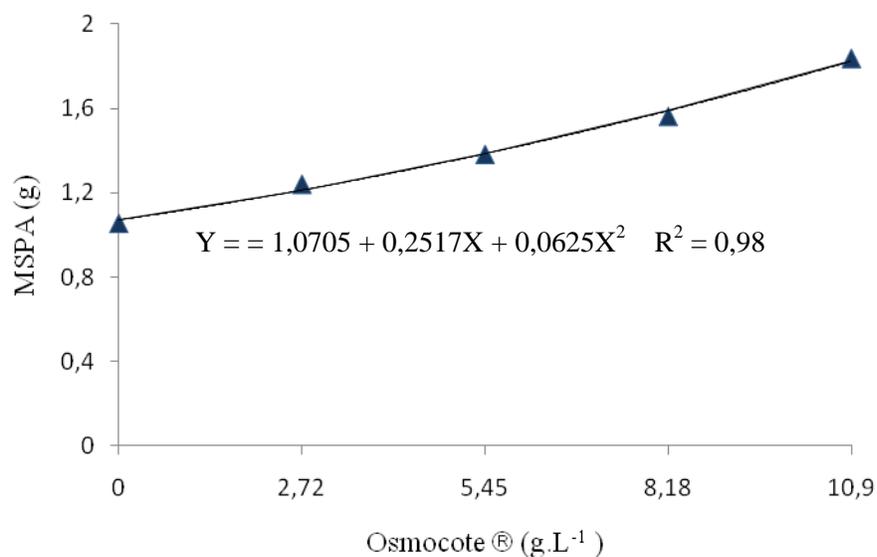


Figura 8 Massa seca da parte aérea (MSPA) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

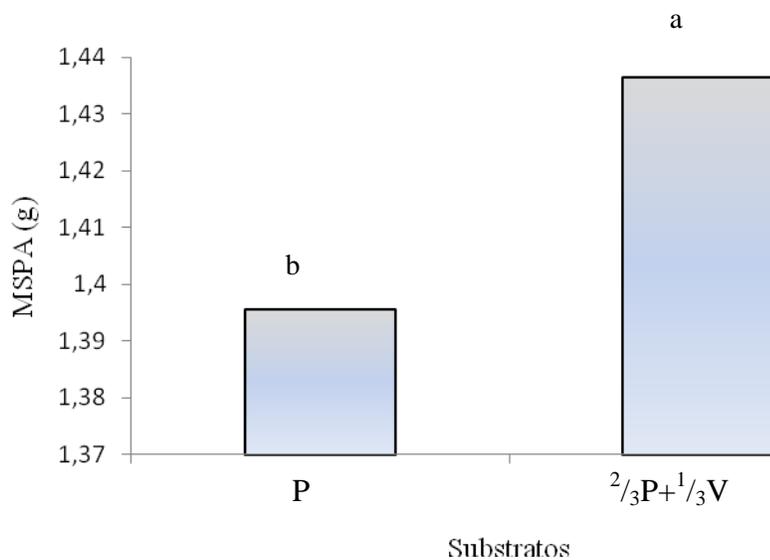


Figura 9 Massa seca da parte aérea (MSPA) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011

A massa fresca do sistema radicular foi significativa para as concentrações de osmocote®, enquanto o peso da matéria seca foi influenciado pelas doses de osmocote® e pelos substratos. Observou-se para essas características uma resposta quadrática para as concentrações do fertilizante de liberação lenta.

A melhor dose para as massas secas e frescas do sistema radicular foi de  $10,9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de osmocote®. Kainuma et al. (2001) relataram que concentrações acima de  $10\text{g}$  deste mesmo fertilizante por litros de substrato comercial podem causar desequilíbrios entre a parte aérea e o sistema radicular de mudas de cafeeiro, sendo essa concentração suficiente para produzir mudas de café com bons índices de qualidade e características morfológicas, o que também foi constatado também por Marcuzzo et al. (2005) utilizando concentrações de Osmocote® a partir de  $8,64\text{L}^{-1}$ .

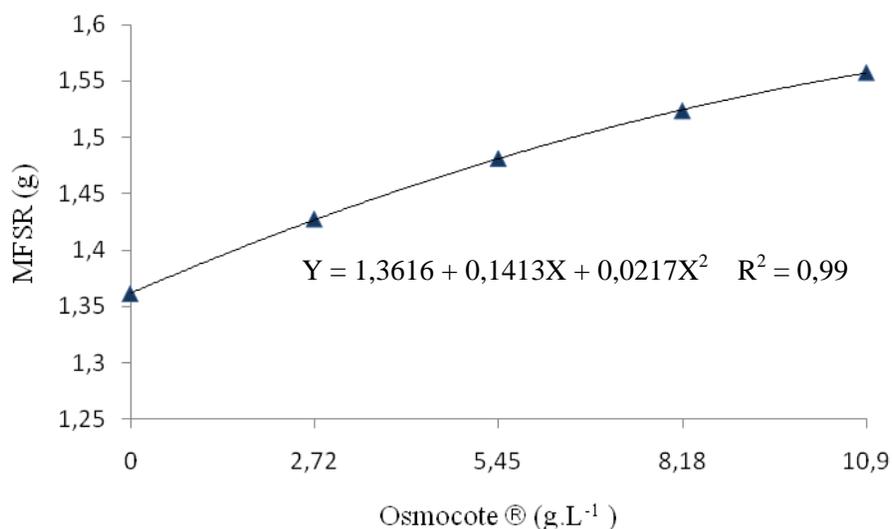


Figura 10 Massa fresca do sistema radicular (MFSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

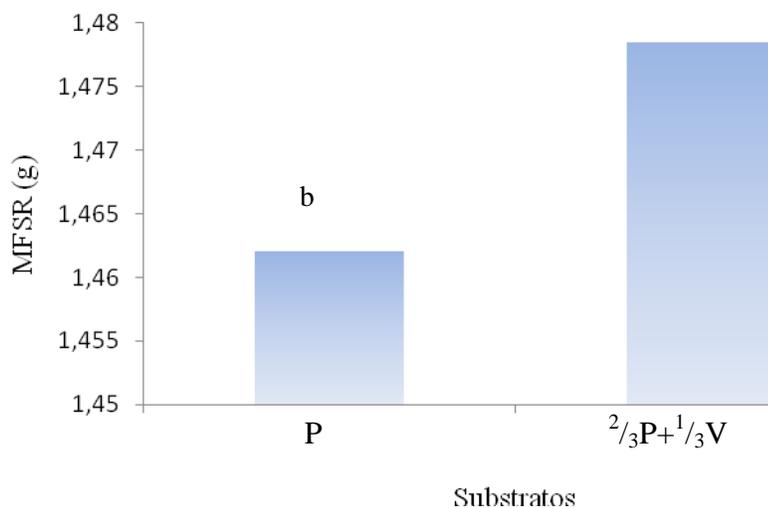


Figura 11 Massa fresca do sistema radicular (MFSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011

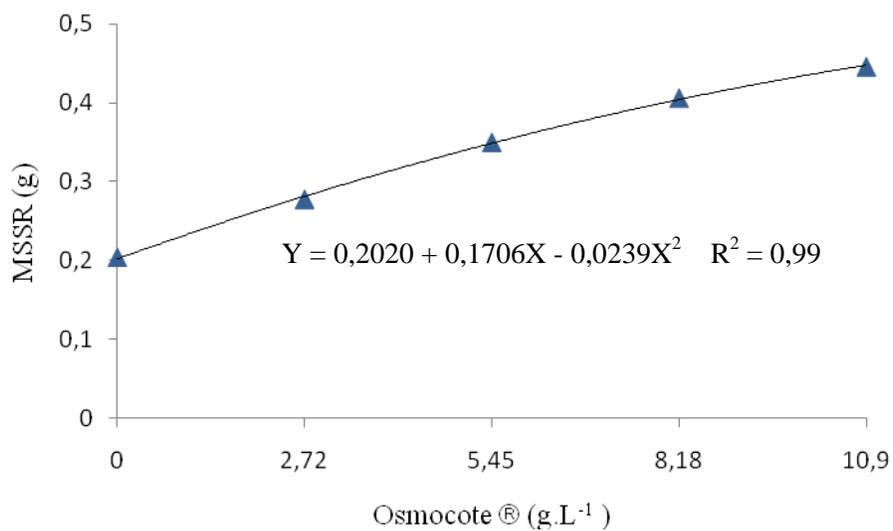


Figura 12 Massa seca do sistema radicular (MFSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

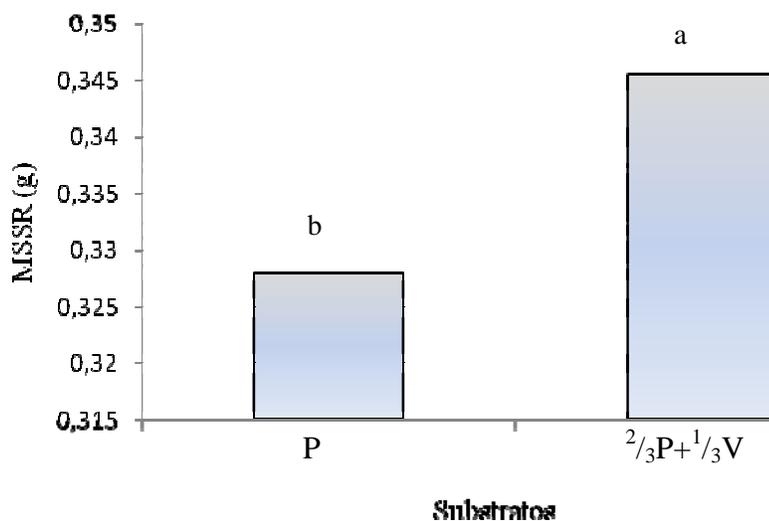


Figura 13 Massa seca do sistema radicular (MSSR) em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos. Muzambinho, MG, 2011

Procedeu-se a análise de folhas das mudas de cafeeiros quantificando-se os teores de macro e micronutrientes na matéria seca. De posse desses valores, foram realizadas as análises estatísticas dos teores de nutrientes em relação às doses do adubo de liberação lenta (osmocote®), aos substratos e à interação entre osmocote® e substratos.

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão representados na Tabela 6. Houve efeito significativo para a interação entre os substratos e as concentrações de osmocote® para os teores de nitrogênio e fósforo. Os teores de cálcio, magnésio e enxofre diferiram entre si apenas para as concentrações do fertilizante de liberação lenta. Não houve efeito significativo para os teores de potássio em folhas de mudas de cafeeiro, porém os teores obtidos neste trabalho estão de acordo com Malavolta (1993), onde teores de 1,9 a 2,4 dag.kg<sup>-1</sup> são considerados adequados para plantas adultas de

café. Rodrigues (1997) encontrou teores da ordem de  $2,8 \text{ dag.kg}^{-1}$  em folhas de plantas de 6,5 meses de idade e considerou-os adequados.

Tabela 6 Análise de variância para as características teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). Muzambinho, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Osmocote	4	98,8**	3,642**	0,3571ns	11,649**	0,984**	0,670**
Substrato	1	6,162**	0,030ns	0,1200ns	0,0640ns	0,016ns	0,001ns
Osm.*Sub	4	0,459**	0,032**	0,194ns	0,0596ns	0,041ns	0,001ns
Erro	30	0,131	0,011	0,152	0,0390	0,016	0,005
C.V. (%)		1,40	5,08	1,83	2,02	3,03	8,08

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

O nitrogênio é um nutriente bastante móvel na planta, sendo essencial para a produção de aminoácidos, proteínas, hormônios de crescimento e fitoalexinas (HUBER, 1980). Os maiores teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre foram obtidos quando se utilizou a concentração de  $10,9 \text{ g}$  de osmocote®.L<sup>-1</sup>, tanto nos substratos plantmax florestal® (P) e plantmax florestal® + vermiculita (Figura 14).

De acordo com o esperado, o teor de nitrogênio ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) nas folhas aumentou, com a elevação das concentrações de osmocote® adicionado aos substratos, atingindo os teores de  $34,44 \text{ g.Kg}^{-1}$  e  $33,43 \text{ g.Kg}^{-1}$ , respectivamente. Segundo Malavolta (1993), teores de 27 a  $32 \text{ g.Kg}^{-1}$ , são considerados adequados para plantas adultas de cafeeiro.

Gontijo (2004) trabalhando com produção de mudas de cafeeiros obteve teores de nitrogênio nas folhas variando de 23,2 a  $30,7 \text{ g.Kg}^{-1}$ , enquanto Guimarães (1994), encontrou teor foliar médio de N de  $39,9 \text{ g.Kg}^{-1}$ , valor este superior aos encontrados no presente trabalho.

No presente trabalho pode-se observar que a produção da matéria seca da parte aérea e sistema radicular das mudas de cafeeiro foi significativamente

influenciada pelo aumento das concentrações do fertilizante de liberação lenta – osmocote. O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos pelo cafeeiro e resulta em maior resposta ao bom desenvolvimento e produtividade do cafeeiro, o que justifica, o maior acúmulo de matéria seca nos tratamentos com concentrações maiores de Osmocote® (MALAVOLTA et al., 1974).

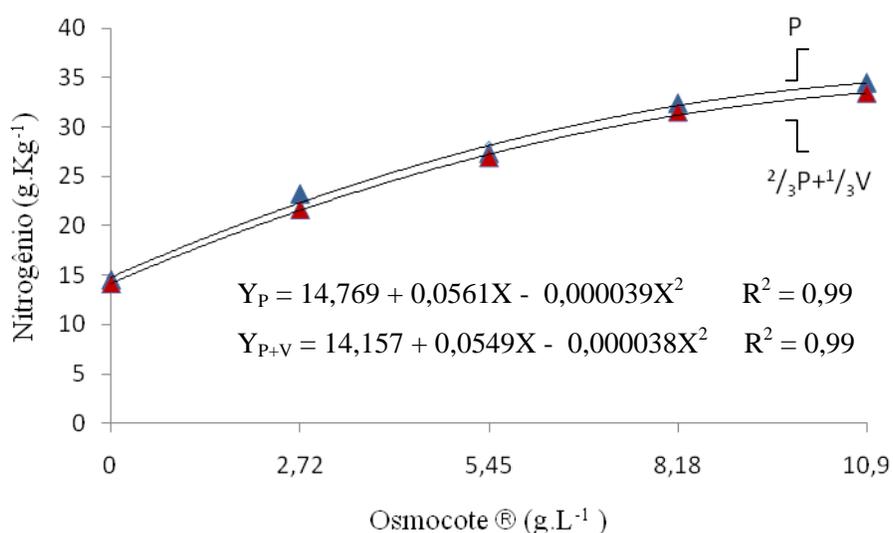


Figura 14 Teores foliares de nitrogênio em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento da planta (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA,1997), entretanto, para mudas de cafeeiro, as exigências de fósforo no crescimento e no desenvolvimento, quando comparadas a outros macronutrientes, são relativamente pequenas. Isso provavelmente explica o fato de que o alto poder de fixação do fósforo aos solos tropicais são raramente encontrados sintomas de deficiência desse elemento no campo (MALAVOLTA et al., 1974).

Os teores foliares de fósforo observados na Figura 15 estão entre 1,12 a 3,01g.kg<sup>-1</sup>, de acordo com a disponibilidade do fertilizante de liberação lenta.

Braccini (1995) e Rodrigues (1997) encontraram teores de P variando de 1,6 a 2,7 g.kg<sup>-1</sup> e consideraram adequados para plantas jovens de café com nutrição equilibrada.

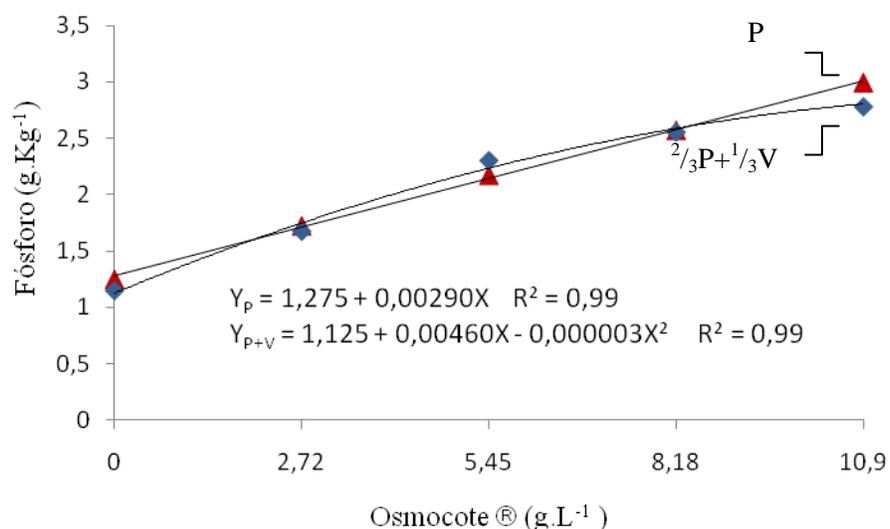


Figura 15 Teores foliares de fósforo em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Os teores de cálcio em folhas de cafeeiro apresentam resposta quadrática, onde os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 10,9g de osmocote.L<sup>-1</sup> (Figura 16).

Os teores foliares de cálcio observados (8,07 a 10,88 g.kg<sup>-1</sup>) estão próximos aos limites considerados ideais por Malavolta (1993), que indica como adequados para plantas adultas teores entre 1,0 a 1,4 dag.kg<sup>-1</sup> e Rodrigues (1997) que encontrou em plantas jovens teores entre 1,1 a 1,9 dag.kg<sup>-1</sup>.

O cálcio é um nutriente importante no crescimento e desenvolvimento das raízes, retenção de folhas, desenvolvimento das gemas e na formação de proteínas, sendo essencial para a aclimatização de mudas de cafeeiro micropropagadas em condições de laboratório.

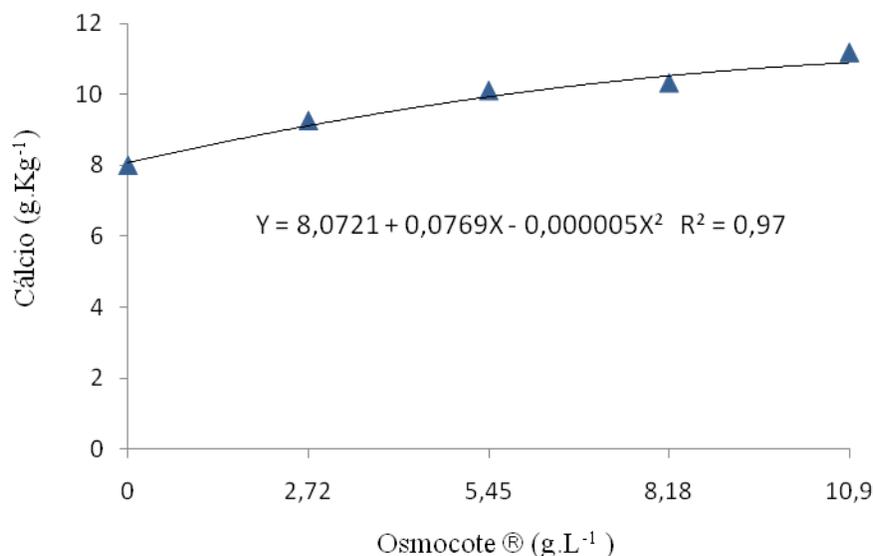


Figura 16 Teores foliares de cálcio em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Teores de Magnésio apresentaram uma resposta quadrática em relação às concentrações do adubo de liberação lenta, onde os maiores teores foram obtidos utilizando 10,9 g de osmocote.L<sup>-1</sup> (Figura 17).

Braccini (1995) e Rodrigues (1997) obtiveram teores foliares de magnésio entre 2,7 a 3,8 g.kg<sup>-1</sup> em plantas jovens de café com nutrição adequada, resultados semelhantes aos obtidos no presente experimento, onde os teores de magnésio variaram entre 3,72 a 4,40 g.kg<sup>-1</sup>, sendo consideradas superiores àquelas apresentadas por Malavolta (1993), que considera adequadas para o cafeeiro, teores na faixa de 0,27 a 0,36 dag.kg<sup>-1</sup> para magnésio.

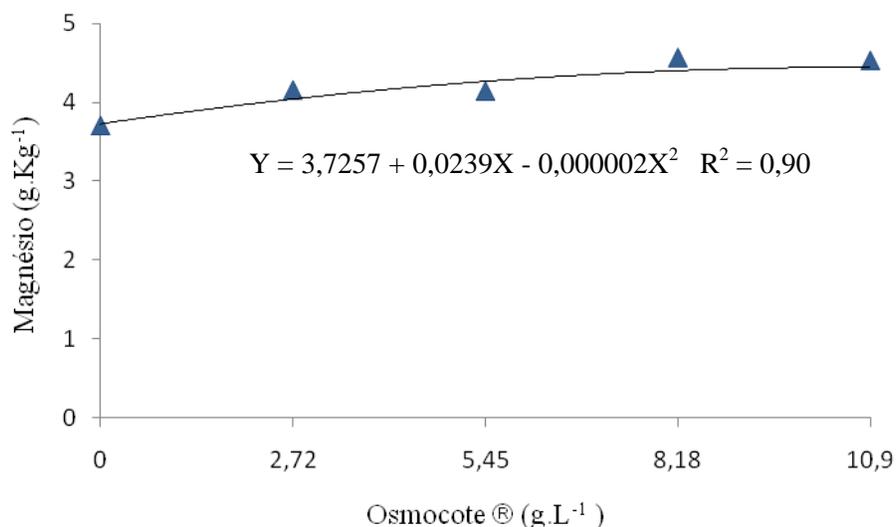


Figura 17 Teores foliares de nitrogênio em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Os teores foliares de Enxofre variaram entre 0,54 a 1,36 g.Kg<sup>-1</sup> (Figura 18), ficando estes abaixo dos considerados adequados (1,5 a 2,0 g.Kg<sup>-1</sup>) por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Não foram encontrados na literatura referências de sua relação com o desenvolvimento do cafeeiro, entretanto, o S tem importante função no metabolismo vegetal é incorporado a aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, óleos aromáticos e ferredoxinas (MARSCHNER, 1995), podendo dessa forma, atuar no desenvolvimento de mudas de cafeeiro.

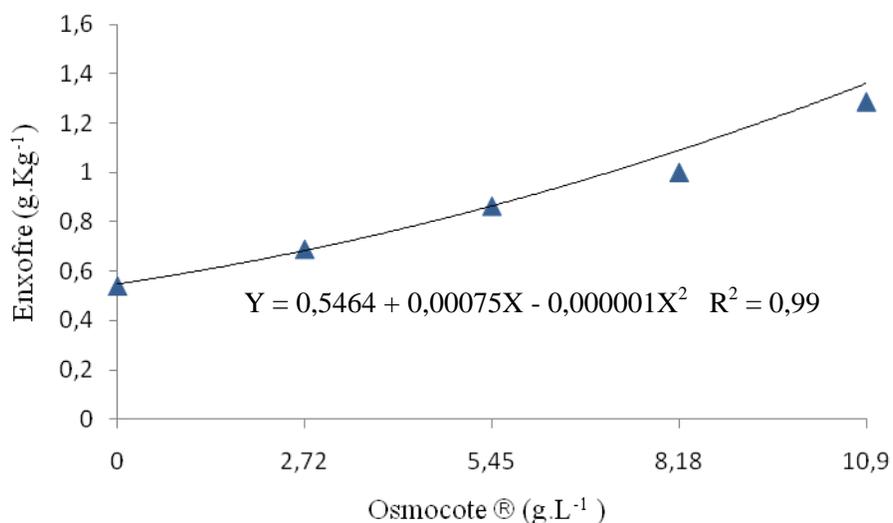


Figura 18 Teores foliares de enxofre em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes doses do fertilizante de liberação lenta Osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão representados na Tabela 7. Houve efeito significativo para a interação entre os substratos e as concentrações de osmocote® para os teores de boro, cobre e zinco. Não houve efeito significativo para os teores de ferro e manganês.

Tabela 7 Análise de variância para as características teores de boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn). Muzambinho, MG, 2011

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio				
		B	Cu	Fe	Mn	Zn
Osmocote	4	21,23**	15,07**	0,062ns	0,0983ns	86,5300**
Substrato	1	0,010ns	0,225**	0,036ns	0,2102ns	2,5452*
Osm.*Sub	4	2,011**	7,522**	0,154ns	0,1108ns	3,3990**
Erro	30	0,297	0,028	0,039	0,0994	0,4941
C.V. (%)		1,11	3,39	0,27	0,26	7,08

\* e \*\*, significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Os teores foliares de boro variaram entre 46,03 a 50,36 mg.Kg<sup>-1</sup> nas diferentes concentrações de osmocote® e substratos (Figura 19), ficando estes nas concentrações consideradas adequadas (20 a 90 mg.Kg<sup>-1</sup>) por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

Na planta, o boro atua na formação da parede celular, divisão celular; aumento das células e transporte de carboidratos, sendo este responsável pelo crescimento do cafeeiro (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

A necessidade da adição de adubos de liberação lenta (osmocote® 15-10-10 + micronutrientes) aos substratos apresenta grande importância na aclimatização de mudas de cafeeiros produzidas *in vitro*, pois entre os micronutrientes adicionados se encontra o boro, nutriente pouco móvel na planta, necessitando de constante suprimento para atender as necessidades do cafeeiro.

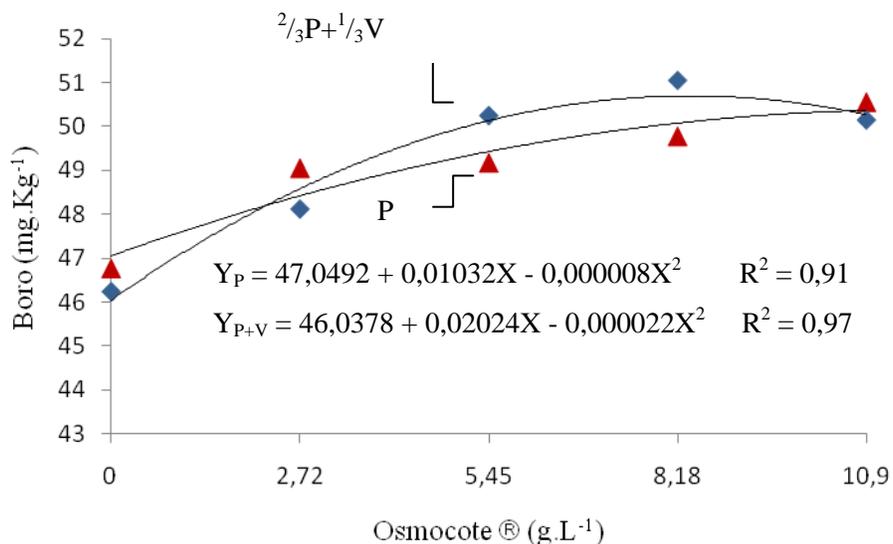


Figura 19 Teores foliares de boro em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

Os teores foliares de cobre se encontraram entre 2,6 a 5,8 mg.Kg<sup>-1</sup> respectivamente entre as doses de 0 a 10,9g de osmocote.L<sup>-1</sup> (Figura 20). O teor foliar médio de 7,58 mg.Kg<sup>-1</sup> encontrado por Guimarães (1994) situa-se na faixa crítica estabelecida. Gonçalves (2005) encontrou de 1,31 a 1,75 mg.Kg<sup>-1</sup>, faixa crítica com teores foliares inferiores aos encontrados no presente trabalho. As faixas críticas encontradas por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), Matiello (1997), Mills e Jones Junior (1996), Reuter e Robinson (1988) e Wilson (1985), para plantas em produção, variaram de 7 a 50 mg.Kg<sup>-1</sup>.

O cobre atua em vários processos fisiológicos das plantas, como a fotossíntese, a respiração, no metabolismo de proteínas e entra em processo de ativação de resistência das plantas (fitoalexitas), apresentando funções essenciais no crescimento e desenvolvimento de mudas de cafeeiro (MATIELO, 2007).

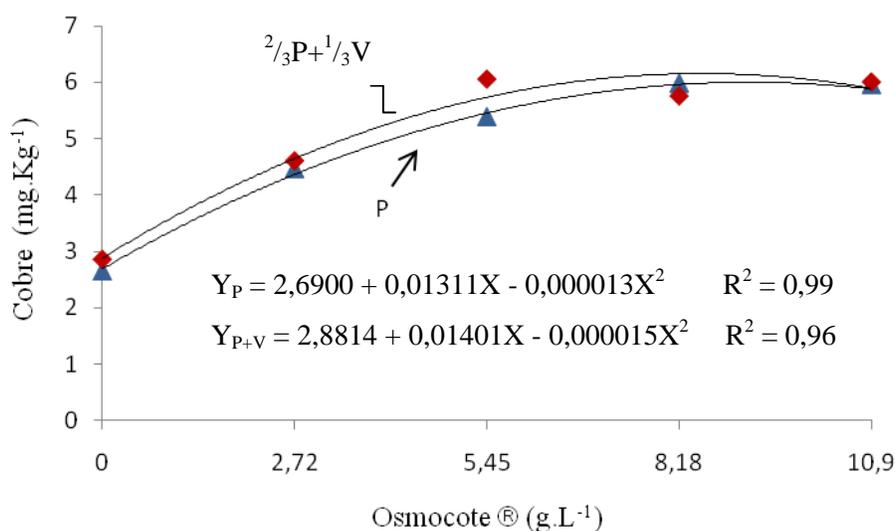


Figura 20 Teores foliares de cobre em plantas de cafeeiro cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta Osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

O zinco é um micronutriente que está intimamente ligado a áreas de crescimento da planta, por ser responsável pela formação do ácido indol acético, que é um hormônio de crescimento presente nos vegetais.

Os teores foliares de zinco foram influenciados tanto pelos substratos quanto pelas concentrações de osmocote®, onde os melhores resultados foram obtidos na concentração de 10,9g de Osmocote.L<sup>-1</sup>, tanto no substrato plantmax® como no plantmax®+vermiculita (Figura 20). Os teores de zinco em folhas de mudas micropropagadas de *C. arabica* utilizando diferentes substratos e concentrações de osmocote® foi entre 25,9 a 55,5 mg.Kg<sup>-1</sup>.

De acordo com Gontijo et al. (2007) que avaliaram em seu experimento a época utilizada para fazer a associação dos níveis de adubação com os teores... foliares de zinco foi exatamente no estágio de 5 pares de folhas verdadeiras, pois o efeito significativo foi observado apenas nesse estágio de desenvolvimento com os teores de zinco nas folhas das mudas variaram de 3,66 a 4,67 mg.Kg<sup>-1</sup>. O maior valor entre os encontrados no limite inferior das faixas para as diferentes características avaliadas foi de 3,68 mg.Kg<sup>-1</sup> e o menor encontrado no limite superior das faixas foi de 4,08 mg.Kg<sup>-1</sup>, determinando-se, assim, a faixa crítica dos teores foliares de zinco.

Guimarães (1994) encontrou um teor médio de 16,94 mg/kg, superior aos da faixa crítica estabelecida no presente trabalho. Gonçalves (2005), trabalhando com mudas produzidas em tubetes, estabeleceu uma faixa de 12,08 a 15,54 mg.Kg<sup>-1</sup>, também com teores superiores aos encontrados neste trabalho. Malavolta (1993), Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), Matiello (1997), Mills e Jones Junior (1996) e Wilson (1985) estabeleceram faixas críticas para plantas em produção, em que os teores foliares de zinco variaram de 8 a 30 mg.Kg<sup>-1</sup>, ou seja, inferiores aos encontrados no presente trabalho.

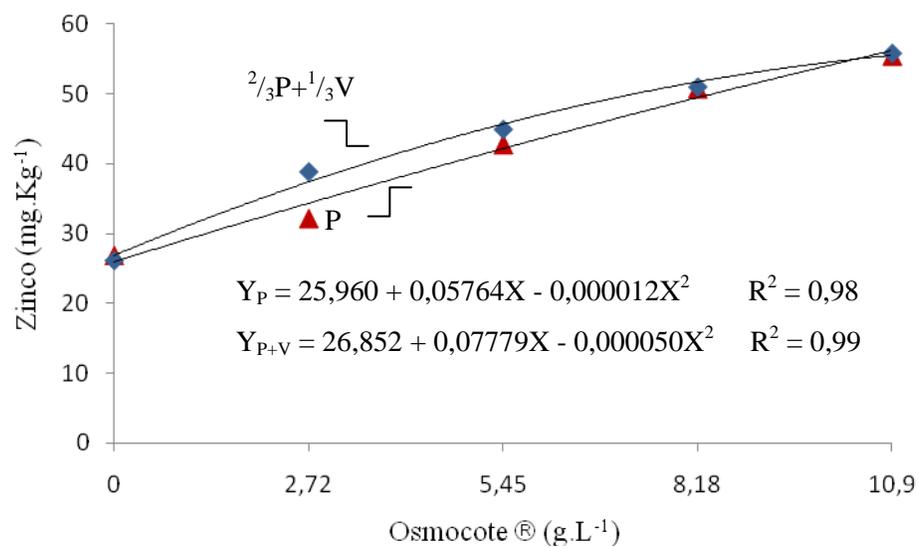


Figura 21 Teores foliares de zinco em plantas de café cultivadas em diferentes substratos e doses do fertilizante de liberação lenta osmocote®. Muzambinho, MG, 2011

#### 4 CONCLUSÕES

- a) O maior porcentual de conversão de embriões cotiledonares em plântulas é obtido utilizando embriões cotiledonares médios (1,51 – 2,50cm) cultivados no substrato plantmax florestal®.
- b) Embriões cotiledonares aclimatizados em substrato composto por plantmax florestal® e vermiculita apresentam maior porcentagem de conversão para plântulas em curva crescente com concentrações de 0 a 2,0ml.L<sup>-1</sup> do bioestimulante Stimulate®.
- c) O fertilizante de liberação lenta osmocote® (15-10-10 + micronutrientes) em dose de 10,9 g.L<sup>-1</sup> proporciona melhor qualidade de mudas de cafeeiro e exerce efeito positivo sobre as características agronômicas e nutricionais das mudas de cafeeiros oriundas de embriogênese somática.

## REFERÊNCIAS

- BARRY-ETIENNE, D. et al. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 77-85, 2002.
- BARBIZAN, E. L. et al. Produção de mudas de cafeeiro em tubetes associada a diferentes formas de aplicação de fertilizantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p. 1471-1480, dez. 2002. Edição Especial.
- BRACCINI, M. C. L. **Comportamento de nove populações de café quanto à tolerância ao alumínio em solução nutritiva**. 1995. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.
- CAMPINHOS JÚNIOR, E.; IKEMORI, Y. K.; MARTINS, F. C. G. Determinação do meio de crescimento mais adequado à formação de mudas de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp. em recipientes plásticos rígidos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, 1., 1984, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1984. p. 350-365.
- CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, 1999.
- CASTRO, P. R. C.; PACHECO, A. C.; MEDINA, C. L. Efeitos de stimulate e de micro-citros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranjeira ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* l. osbeck). **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 338-341, 1998.
- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba; Agropecuária, 2004. p. 132.
- CATUNDA, P. H. A. **Aclimatização de plântulas micropropagadas**. 2004. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- COSTA, A. C. M.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O. Mudas em tubetes: novos componentes em misturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 26., 2000, Marília. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBG / GERCA, 2000. p. 230-231.

GONÇALVES, M. S. **Faixas críticas de teores foliares de nutrientes em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) produzidas em tubetes.** 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: CBAB, 1998. p. 183-260.

GUIMARÃES, P. T. G. et al. A produção de mudas de cafeeiros em tubetes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 98-109, 1998.

GUIMARÃES, R. J. **Análise do crescimento e da quantificação de nutrientes em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), durante seus estádios de desenvolvimento em substrato padrão.** 1994. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HUBER, D. M. The role of mineral nutrition in defense. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Ed.). **Plant pathology: and advanced treatise.** New York: Academic, 1980. p. 381- 406.

KAINUMA, R. H. et al. Qualidade de mudas de *Coffea arabica* L. desenvolvidas em diferentes substratos e doses de adubo de liberação lenta. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Vitória: [s. n.], 2001. p. 127.

LANA, R. M. Q. et al. Utilização de diferentes substratos e fertilizantes de liberação lenta na produção de mudas de cafeeiro em saquinhos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 286, n. 49, p. 577-586, 2002.

LANDIS, T. D. et al. Seedling nutrition and irrigation. In: **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** The container tree nursery manual. Washington, 1989. 119 p, v. 4. (Agriculture Handbook, 674).

LIMA, J. D. et al. Crescimento e nutrição de mudas de bananeira em substrato contendo resíduos da agroindústria de chá preto durante a aclimatização. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 37-42, 2009.

MALAVOLTA, E. et al. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. São Paulo: Pioneira, 1974. 752 p.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do cafeeiro**: colheitas máximas econômicas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1993. 210 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira de Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.

MARANA, J. P. et al. Índice de qualidade e crescimento de mudas de café produzidas em tubetes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 39-45, 2008.

MARCUZZO, K. V. et al. Desenvolvimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em diferentes substratos e doses de fertilizante de liberação gradual. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 57-63, Jan./Apr. 2005.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 1995. 889 p.

MATIELLO, J. B. **Gosto do meu cafezal**. Rio de Janeiro: Globo Rural, 1997. 139 p.

MELO, B.; MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, P. T. G. Doses crescentes de fertilizante de liberação lenta na produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESQUISAS CAFEEIRAS, 25, 1999, Franca. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBG/GERCA, 1999. p. 174-175.

MILLS, H. A.; JONES JUNIOR, J. B. **Plant analysis handbook II**. 2nd ed. Athens: Micro-Macro, 1996. 422 p.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

NOMURA, E. S. et al. Crescimento de mudas micropropagadas da bananeira cv. Nanicão, em diferentes substratos e fontes de fertilizante. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 359-363, 2008.

REUTER, D. J.; ROBINSON, J. B. **Plant analysis**: an interpretation manual. 2. ed. Melbourne: Inkata, 1988. 218 p.

RODRIGUES, L. A. **Crescimento e composição mineral na parte aérea e nas raízes de duas variedades de café em resposta à calagem na superfície do solo.** 1997. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

SANTOS, C. M. G. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento do algodoeiro.** Cruz das Almas. 2004. 61 f. Tese (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, Cruz das Almas, 2004.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2004.

WILSON, K. C. Mineral nutrition and fertilizer needs. In: CLIFORD, N. N.; WILLSON, K. C. (Ed.). **Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage.** Croom Helm: [s. n.], 1985. p. 135-156, part 6.