



ANA LUIZA DE OLIVEIRA VILELA

**ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ ORIUNDAS DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS: APROVEITAMENTO DE SEMENTES
ENVELHECIDAS**

**LAVRAS - MG
2020**

ANA LUIZA DE OLIVEIRA VILELA

**ACCLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ ORIUNDAS DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS: APROVEITAMENTO DE SEMENTES ENVELHECIDAS**

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.

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

**LAVRAS - MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vilela, Ana Luiza de Oliveira.

Aclimatização de mudas de café oriundas de embriões
zigóticos: Aproveitamento de sementes envelhecidas / Ana Luiza de
Oliveira Vilela. - 2020.

81 p. : il.

Orientador(a): Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Coffea arabica L. 2. Cultura *in vitro*. 3. Produção de mudas.
I. Rosa, Sttela Dellyzete Veiga Franco da. II. Título.

ANA LUIZA DE OLIVEIRA VILELA

**ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ ORIUNDAS DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS: APROVEITAMENTO DE SEMENTES ENVELHECIDAS**

**ACCLIMATIZATION OF COFFEE CLEANING FROM ZYGOTIC EMBRYOS: USE
OF AGED SEEDS**

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 junho de 2020.

Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho EMBRAPA
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho EMBRAPA
Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires UFLA
Dra. Patrícia de Oliveira Alvim Veiga IFSULDEMINAS

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

**LAVRAS - MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Pesquisadora Doutora Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela sua disponibilidade, cordialidade e incentivo, que foram fundamentais para realizar, prosseguir e terminar esta tese. Serei eternamente grata por todo o apoio e compreensão!

Gostaria de agradecer também à banca, que se dispôs a participar da defesa da tese, pelas contribuições, tempo e disposição: Raquel Maria de Oliveira Pires, Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Patrícia de Oliveira Alvim Veiga, Milene Alves de Figueiredo Carvalho, André Delly Veiga e André Dominghetti Ferreira.

Agradeço especialmente à pós doutoranda Stefânia, cuja ajuda foi imprescindível para o termino do trabalho. À doutoranda Cristiane e às doutoras Ana Cristina (Tina) e Madeleine, pela ajuda no início do projeto e pela grande amizade durando todo o curso. A todos os colegas do 'Time Sttela' e a todos do departamento, pois muitos se tornaram grandes amigos!

Aos meus pais, Aurora e Antônio, pelo amor e apoio incondicional em todas as minhas decisões nas diferentes etapas da minha vida. Aos meus irmãos Aline e Alexandre, e aos sobrinhos Laís e Thomas.

Agradeço também à Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitotecnia e ao Setor de Sementes, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O café é um dos produtos de maior importância no mercado mundial, sendo o Brasil o maior produtor e exportador desta *commodity*, cuja propagação é ainda realizada por mudas produzidas a partir de sementes. No entanto, existe uma perda da viabilidade das sementes em poucos meses após a colheita. Um dos fatores que podem ter interferência na germinação e emergência das sementes de café é o endosperma, rico em substâncias fenólicas que podem influenciar no processo de crescimento do embrião. A excisão do embrião da semente e posterior cultivo *in vitro* eliminaria o problema da oxidação por este tipo de composto. Contudo, um número substancial de plantas cultivadas *in vitro* não sobrevive a transferência para condições de ambientes *ex vitro*. A maioria das espécies cultivadas *in vitro* requerem um processo de aclimatização para assegurar que um número suficiente de plantas sobreviva e cresça vigorosamente quando transferido para o solo. Assim, objetivou-se com esse trabalho desenvolver estudos sobre a cultura *in vitro* de embriões zigóticos de sementes recém-colhidas e sementes envelhecidas de *Coffea arabica* L., bem como a aclimatização de mudas de café produzidas a partir dessas sementes. Dois estudos foram realizados, sendo que no primeiro trabalho foi avaliada a cultura *in vitro* de embriões zigóticos exisados de sementes de café recém-colhidas ou sementes que passaram pelo envelhecimento acelerado. Os embriões zigóticos foram extraídos das sementes e colocados em contato com meio MS e, após 60 e 120 dias, as plantas foram avaliadas por meio da germinação *in vitro*, contagem de plântulas normais, anormais e mortas. No segundo estudo foram feitos testes de aclimatização dessas plântulas cultivadas. Foram avaliados dois tempos de cultura para transplântio da fase *in vitro* para a *ex vitro* (60 e 120 dias), dois substratos (Tropstrato e fibra de coco); e dois ambientes (câmara de crescimento e casa de vegetação com nebulização). Para comparar os resultados, foram avaliados a altura das plantas, o diâmetro do caule, o número de folhas e o teor de clorofila, taxas de crescimento e índice de velocidade de crescimento. Conclui-se que a germinação *in vitro* de embriões zigóticos vindos de sementes envelhecidas foi menor que as recém-colhidas, mas ainda assim, foi satisfatório com 86%. Não houve diferença entre as qualidades das sementes quanto ao o número de plântulas normais. As plântulas que foram transplantadas aos 60 dias obtiveram melhor desempenho que aquelas transplantadas aos 120 dias. O ambiente casa de vegetação com nebulização foi melhor para o crescimento das mudas, possivelmente pela maior radiação e temperatura. O melhor substrato foi a fibra de coco, por garantir melhor desenvolvimento, tanto para mudas de sementes recém-colhidas quanto para as de sementes envelhecidas. Com isso, conclui-se que é possível desenvolver mudas sadias a partir de sementes com menor viabilidade, como as envelhecidas utilizadas nesse estudo.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Cultura *in vitro*. Substrato.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important products on the world market, Brazil is the largest producer and exporter of this commodity, whose propagation is still carried out by seedlings produced from seeds. However, there is a loss of seed viability in a few months after harvest. One of the factors that may interfere with the germination and emergence of coffee seeds is the endosperm, rich in phenolic substances that can influence the embryo's growth process. Excision of the embryo from the seed and subsequent cultivation *in vitro* would eliminate the problem of oxidation by this type of compound. However, a substantial number of plants *in vitro* do not survive the transfer to greenhouse or growth chamber conditions. Most species grown *in vitro* require an acclimatization process to ensure that a sufficient number of plants survive and grow vigorously when transferred to the soil. Thus, the objective of this work was to develop studies on the *in vitro* culture of zygotic embryos from freshly harvested seeds and aged seeds of *Coffea arabica* L., as well as the acclimatization of coffee seedlings produced from these seeds. Two studies were carried out, the first study evaluating the *in vitro* culture of freshly harvested coffee seeds or seeds that have undergone accelerated aging. The zygotic embryos were extracted from the seeds and placed in contact with MS medium and, after 60 and 120 days, the plants were evaluated by counting normal, abnormal and dead seedlings. In the second study, acclimatization tests were carried out on these seedlings grown *in vitro*. Two times of culture were evaluated for transplanting from the *in vitro* to the *ex vitro* phase (60 and 120 days), two substrates (Tropstrato and coconut fiber); two environments (growth chamber and greenhouse with fogging). To compare the results, plant height, stem diameter, number of leaves and chlorophyll content were evaluated. It was concluded that the *in vitro* germination of zygotic embryos from aged seeds was less than recently harvested, but it was still satisfactory with 86%. But there was no difference between the qualities of the seeds in terms of the number of normal seedlings. Plants that were transplanted at 60 days performed better than those transplanted at 120 days. The greenhouse environment with fogging was better for seedling growth, possibly due to higher radiation and temperature. The best substrate was coconut fiber, as it ensures better development for both freshly harvested seedlings and aged seedlings. It is possible to develop healthy seedlings from seeds with less viability, such as the aged ones used in this study.

Keywords: *Coffea arabica* L. *In vitro* culture. substrate.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	O café e sua importância sócio-econômica.....	12
2.2	Caracterização das sementes de café.....	12
2.3	Embriões zigóticos.....	14
2.4	Aclimatização das plantas.....	15
2.4.1	Substrato	16
2.4.2	Luminosidade.....	17
2.4.3	Temperatura e umidade	18
	REFERÊNCIAS	20
	CAPÍTULO 2 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CAFÉ PROVENIENTES DE SEMENTES RECÉM COLHIDAS E SEMENTES ENVELHECIDAS	25
1	INTRODUÇÃO	27
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1	Local e material vegetal	28
2.2	Colheita, seleção e processamento das sementes	28
2.3	Obtenção dos lotes de sementes.....	28
2.4	Assepsia das sementes	29
2.5	Extração e cultura <i>in vitro</i> dos embriões.....	29
2.6	Avaliações.....	30
2.6.1	Teste de germinação das sementes.....	30
2.6.2	Germinação <i>in vitro</i>	30
2.6.3	Análise de crescimento	31
2.7	Delineamento experimental e análises estatísticas	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1	Qualidade das sementes dos lotes utilizados.....	32
3.2	Germinação <i>in vitro</i>	33
4	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXOS	44

	CAPITULO 3 ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ OBTIDAS DE CULTURA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE SEMENTES ENVELHECIDAS.....	
	45
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1	Local e material vegetal	49
2.2	Colheita, seleção e processamento das sementes	49
2.3	Obtenção dos lotes de sementes.....	49
2.4	Assepsia das sementes	50
2.5	Extração e cultura <i>in vitro</i> dos embriões	50
2.6	Aclimatização das mudas.....	50
2.7	Avaliações das mudas de café.....	51
2.8	Análise de crescimento das plântulas de café	52
2.9	Índice de velocidade de crescimento em altura	53
2.10	Delineamento experimental e análises estatísticas	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1	Germinação <i>in vitro</i>	54
3.2	Resultados da aclimatização das mudas café.....	55
3.3	Análise de clorofilas.....	63
3.4	Análises de crescimento	66
3.5	Índice de velocidade de crescimento.....	73
4	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXOS	80

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo, sendo o *Coffea arabica* L. representante de mais de 75% da estimativa de produção total de café do país, o que corresponde a 81% da área existente. Minas Gerais concentra a maior área com a espécie, 1,22 milhão de hectares, 71% da área total de lavouras de café arábica no país (CONAB, 2020). Ainda de acordo com a CONAB (2020), a produção da safra de 2019 foi de 34,30 milhões de sacas, contribuindo substancialmente para a pauta de exportações brasileiras, sendo uma das culturas de maior expressão, tanto no mercado interno quando no externo.

Para a formação de novas lavouras é necessário a obtenção de mudas de alto padrão de qualidade para garantir a sua sobrevivência quando levadas ao campo, influenciando em um estande ideal e uniforme. Essas mudas são comumente produzidas a partir de sementes, que necessitam ter alta germinação e vigor.

Entretanto, sementes de café apresentam rápida perda da viabilidade durante o armazenamento. Um dos fatores que podem interferir na rápida perda da viabilidade é o endosperma, rico em substâncias fenólicas que podem influenciar na germinação e no desenvolvimento do embrião. Ademais, estudos têm demonstrado que o endosperma de sementes de café possui uma maior suscetibilidade aos danos de deterioração do que o embrião (DUSSERT *et al.*, 2006, COELHO *et al.*, 2015). Dessa forma, a excisão do embrião zigótico da semente e seu cultivo *in vitro* poderia auxiliar na regeneração de plântulas de café possibilitando a formação de mudas a partir de sementes com baixa qualidade fisiológica.

Além disso, as mudas advindas de embriões extraídos de sementes armazenadas podem ser produzidas em qualquer época do ano, dessa forma, possibilitam o transplântio para o campo em épocas mais ideais, como em estações chuvosas. Possibilita também a multiplicação de um grande número de plantas de genótipos selecionados e com alto valor agregado. Essa técnica envolve uma série de etapas que se iniciam no estabelecimento da cultura *in vitro* e vai até a fase de aclimatização.

A transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* requer uma estratégia que garanta a sobrevivência, crescimento e o estabelecimento das plântulas, sem grandes perdas (HAZARIKA, 2006). No entanto, um número substancial de plântulas não sobrevive a essa fase de transferência, sendo necessário um processo de aclimatização, ou seja, a transferência de

plântulas cultivadas *in vitro* para um ambiente de transição, com o objetivo de promover uma adaptação gradativa ao ambiente externo.

Para auxiliar na adaptação das plântulas durante a aclimatização, as condições ambientais climáticas precisam ser alteradas progressivamente, de forma a diminuir o estresse, evitando a ocorrência de deterioração e, conseqüentemente, senescência das plântulas (HAZARIKA, 2006). Alguns dos fatores que também devem ser levados em consideração são o tipo de substrato utilizado e as condições do ambiente escolhido para uma melhor adaptação das plantas.

O substrato utilizado deve apresentar algumas características ideais, como composição uniforme, nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plântulas, capacidade de retenção de água e de trocas gasosas entre o sistema radicular e o ar atmosférico, além de ser livre de pragas e patógenos (CAMPINHOS *et al.*, 1984; MELO, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2002), além disso, devem garantir a manutenção mecânica das raízes e a estabilidade da plântula.

As características do ambiente de aclimatização possuem grande influência na adaptação e sobrevivência das mudas, sendo o nível de sombreamento, temperatura e umidade do ar fundamentais para o sucesso da técnica. A luz também é fator fundamental para o crescimento das plantas, no entanto, o sombreamento a determinados níveis pode ser necessário em plantas susceptíveis à radiação (MARTINS, 2015)

Mudas de café são geralmente produzidas em viveiros na presença de sombrite, devido à grande sensibilidade à radiação solar direta (ASSIS *et al.*, 2019; BRAUN *et al.*, 2007; DARDENGO *et al.*, 2013). Santos *et al.* (2014), ao estudarem o processo de aclimatização de mudas de *C. canephora* oriundas do cultivo *in vitro* constataram uma maior sobrevivência de plantas sob nível de sombreamento de 50% quando comparado com o de 30% em viveiro.

A grande perda de água durante o processo de aclimatização é uma das razões para a baixa sobrevivência das plântulas produzidas por meio da cultura de tecidos, sendo preciso, desta forma, promover a adaptação das plântulas em ambientes com baixa umidade relativa do ar, visto que no ambiente *in vitro* há uma alta umidade. Na aclimatização de plântulas de café é comum o plantio em estufas com sistema de nebulização que promove a manutenção da umidade relativa do ar durante o processo de adaptação (ALMEIDA *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2016),

Ambientes com menores temperaturas, também diminuiriam as perdas de água por transpiração, visto que a transpiração das plantas tende a aumentar quando o gradiente de pressão de vapor entre a folha e o ar atmosférico se eleva. Esse gradiente é calculado em função da temperatura e da umidade relativa do ar (HOPKINS, 1995).

Segundo Paiva e Paiva (2001), a temperatura do ar no qual as plântulas devem ser mantidas, durante a fase de aclimatização, deve estar na faixa entre 13 e 30 °C, porém, é determinada, primeiramente, pela espécie da planta em questão. Vários estudos foram feitos a respeito da temperatura ideal na aclimatização de café (SANTANA-BUZZY *et al.*, 2007), porém, poucos foram feitos especificamente para a aclimatização de plântulas produzidas a partir de embriões zigóticos de café.

Como observado, apesar de diversos trabalhos abordarem a aclimatização de plântulas de café, poucos ou inexpressivos são os trabalhos que visam estudar os fatores que influenciam na fase de aclimatização de plântulas de café oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos. Com isso, o objetivo nesse trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* de plântulas oriundas de embriões zigóticos provenientes de sementes recém-colhidas ou de sementes envelhecidas e, também, avaliar a aclimatização dessas plântulas em diferentes substratos e ambientes, a fim de possibilitar a produção mudas de *C. arabica* L bem desenvolvidas e aptas ao plantio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O café e sua importância sócio-econômica

O café possui grande importância no mercado nacional e mundial, sendo o Brasil, o maior produtor e exportador desta commodity (CONAB, 2020). De acordo com o relatório de estimativa da safra 2020 da CONAB, a produção brasileira de café está entre 57,2 milhões e 62,02 milhões de sacas beneficiadas, representando aumento em comparação ao volume produzido na safra passada, entre 15,9% e 25,8%, respectivamente. No país, os estados de Minas Gerais e São Paulo são os maiores estados produtores de café arábica (CONAB, 2020)

O café, espécie arbustiva, pertence à família botânica Rubiaceae, dentre as diversas espécies existentes, as espécies *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre, do gênero *Coffea*, são as que propiciam uma bebida de melhor qualidade, apresentando assim, maior importância econômica (CARVALHO, 2007). O *C. arabica* L. detém 81 % da produção total de café do país, sendo assim, é a espécie mais importante do gênero (CONAB, 2020).

A espécie *C. arabica* é um alotetraplóide com $2n=4x=44$ cromossomos e autógama, com cerca de 10% de polinização cruzada (CARVALHO; MÔNACO, 1964). Devido as cultivares conhecidas atualmente serem derivadas de duas formas botânicas, *typica* e *bourbon* (ANTHONY *et al.*, 2001), sua base genética é estreita.

Dentre as cultivares do *C. arabica*, uma das mais utilizadas no Brasil é o Catuaí, que surgiu do cruzamento artificial de cafeeiros selecionados de ‘Caturra Amarelo’, de porte baixo, e ‘Mundo Novo’. Essa variedade é utilizada em larga escala porque apresenta uma boa qualidade de bebida, além de ser uma planta com alta produtividade, rústica e amplamente cultivada em livre crescimento (SOUZA *et al.*, 2003).

Em 2019, ano de bienalidade negativa, houve um aumento de 12,2% na área em formação de lavouras (CONAB, 2019). E tanto para a renovação e/ou para a implantação das lavouras, são utilizadas mudas que são usualmente originadas de sementes. Com isso, a produção de mudas com alto padrão de qualidade, é necessária para a formação de lavouras uniformes e produtivas, principalmente considerando-se tratar de uma cultura perene.

2.2 Caracterização das sementes de café

O fruto da espécie arábica é uma drupa elipsoide que possui exocarpo (casca), mesocarpo (mucilagem) e o endocarpo coriáceo (pergaminho). O exocarpo é a camada mais

externa e pode ter coloração vermelha ou amarela, no fruto maduro, dependendo da cultivar. O mesocarpo é uma substância gelatinosa rica em açúcares e água, existente entre o exocarpo e o endocarpo. O endocarpo ou pergaminho é coriáceo, quando maduro (RENA; MAESTRI, 1986). O fruto contém, normalmente, dois *locus* e duas sementes envolvidas individualmente pelo pergaminho.

As sementes de café são plano-convexas, elípticas ou ovais, e na face plana dessas sementes encontra-se um sulco longitudinal, sendo constituída de embrião, endosperma e um envoltório, também conhecido como película prateada ou espermoderma (RENA; MAESTRI, 1986). O endosperma é o principal tecido de reserva nas sementes de café, representando 95% da matéria seca da semente, contendo cerca de 10 a 14% de proteínas e 0,5 a 2% de aminoácidos (PIMENTA, 2003).

A semente de café arábica apresenta teores entre 55 a 65,5% de carboidratos; 8 a 11% de ácidos, dentre os quais se destaca: ácido cítrico, málico, clorogênico, acético, butírico e valérico; 1 a 3% de lignina; 15 a 18% de lipídeos; 11 a 15% de compostos nitrogenados; 8,5 a 12% de proteína; 0,8 a 1,4% de cafeína; 3 a 5,4% de minerais (PIMENTA, 2003). O embrião do cafeeiro é pequeno (3 a 4 mm) e se localiza na base da semente, na sua face convexa, apresentando um hipocótilo (eixo embrionário) e dois cotilédones.

As sementes de café arábica são classificadas como intermediárias, pois apresentam sensibilidade à dessecação e a baixas temperaturas, ou seja, são capazes de tolerar níveis de dessecação relativamente mais baixos em comparação às sementes recalcitrantes, porém, não toleram perdas de água extremas como as sementes ortodoxas. Além disso, não toleram baixas temperaturas de armazenamento, o que dificulta a sua conservação a longo prazo (DUSSERT *et al.*, 2003).

Sementes de café possuem também germinação lenta e desuniforme, o que dificulta a obtenção de mudas com alto padrão de qualidade no momento ideal do plantio (ROSA *et al.*, 2010). O endocarpo ou “pergaminho” representa um entrave aos processos de germinação na semente, emergência e crescimento de plântulas de café, embora seja de extrema importância para a proteção das sementes contra microrganismos e danos físicos. Isso pode estar relacionado, dentre outros fatores, a um impedimento à entrada de água durante as etapas iniciais da germinação. A remoção do endocarpo é eficaz no aumento da velocidade de germinação das sementes de café, contudo, é de difícil emprego, podendo ser onerosa e pouco prática. (DUSSERT *et al.*, 2006).

Pereira *et al.* (2002) concluíram que o espermoderma pode contribuir para a lenta germinação da semente de café, possivelmente devido a presença de cafeína. Em outra pesquisa,

Rosa *et al.* (2003) estudaram o efeito da cafeína exógena sobre a germinação e desenvolvimento de embriões das sementes de café e observaram que a germinação e o desenvolvimento de embriões de *C. arabica L.* e *C. canephora* Pierre foram afetados, sendo esse efeito mais drástico nas radículas do que nos cotilédones.

Várias pesquisas têm sido feitas para melhor elucidar as causas dessa perda rápida da viabilidade das sementes de café. Uma vertente dessas pesquisas é a de que o endosperma seria mais sensível a degradação que o embrião da semente, portanto, quando os embriões zigóticos são isolados das sementes podem gerar plântulas saudáveis e mais vigorosas do que a semeadura das sementes (PEREIRA, 2017; FIGUEIREDO, 2016; COELHO *et al.*, 2015; DUSSERT *et al.*, 2006).

2.3 Embriões zigóticos

As sementes de café são constituídas do ponto de vista da propagação, por um embrião, endosperma e um envoltório representado pela película prateada. Pode se dizer que o embrião é a parte mais importante da semente, pois é originado da fecundação de gametas e possui um sistema de tecidos simples, altamente organizado, que pode produzir uma planta completa em um meio de cultura adequado (VALIO, 1980).

O embrião é originado de um processo natural de fecundação. A denominação ‘cultura de embriões’ é empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (FERREIRA; HU, 1998).

Diversos são os fatores que afetam a eficiência e o sucesso da cultura de embriões *in vitro*, tais como a maturidade fisiológica da semente, a desinfestação da semente, a remoção inadequada do embrião, a escolha do meio nutritivo adequado, se há necessidade da utilização de reguladores de crescimento, as substâncias fenólicas liberadas e as condições ambientais de cultivo (ILLG, 1986).

O embrião pode ser excisado e cultivado em condições assépticas em meio de cultura adequada. Para a remoção do embrião, uma vez que ele está alojado em região estéril da semente, deve-se desinfestar apenas a superfície externa da semente. Assim, o índice de contaminação *in vitro* pode ser mais baixo em relação aos demais tecidos (ILLG, 1986).

Apesar de ser uma técnica de elevado custo financeiro, que demanda equipamentos específicos e mão de obra qualificada, a cultura de embriões zigóticos tem várias vantagens, como promover a quebra de dormência, produção de plântulas assépticas, elucidar problemas

relacionados à nutrição do embrião (COLLINS; GROSSER, 1984; FERREIRA; HU, 1998), além de produzir mudas mais uniformes e em épocas adequadas para o plantio.

A técnica também pode ser utilizada para a recuperação de sementes que passaram por períodos de armazenamentos, onde pode ter ocorrido certa perda da viabilidade, como ocorre nos casos de armazenamentos em bancos de germoplasma, ou no envio e transporte para lugares mais longínquos, onde se demanda grande tempo de transporte em condições nem sempre adequadas.

Porém, apesar dos grandes avanços das técnicas de cultura de tecidos, um número substancial de plântulas não sobrevive a transferência *in vitro* para um ambiente e/ou um substrato diferente do inicial. Portanto, estabelecimento de protocolos eficientes que estimulem a adaptação gradativas dessas plântulas em outros ambientes e formação de mudas normais para posterior adaptação ao campo e formação de plantas saudáveis e produtivas, se faz necessário.

2.4 Aclimatização das plantas

O termo aclimatização é comumente confundido com a aclimação, sendo que o procedimento de aclimatização se refere a transferência de plântulas *in vitro* para um ambiente protegido, como câmaras de crescimento ou casas de vegetação com telados, ou seja, ambientes controlados, um processo basicamente artificial (GUERRA; NODARI, 2006). Já a aclimação está atribuída ao processo de adaptação progressiva em ambiente natural (GUERRA; NODARI, 2006; MOREIRA *et al.*, 2006) para que haja o menor número de perdas possíveis. Esse processo representa uma etapa crucial dentro de um programa no qual se trabalha com cultura de embriões. Em várias ocasiões é o fator limitante no processo de cultura *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

O processo de aclimatização é necessário, pois as folhas de plantas cultivadas *in vitro* possuem deficiente quantidade de ceras epicuticulares, cutícula fina e pouca funcionalidade dos estômatos e, portanto, dificilmente sobreviveriam sob condições de baixa umidade relativa do ar. Já as raízes são pouco funcionais na absorção de água e nutrientes, sendo, de modo geral, quebradiças, e, regularmente, morrem ao serem transferidas para um substrato, já que normalmente existem poucas conexões vasculares entre as raízes e a parte aérea (GEORGE, 1996).

Além disso, as plantas que crescem *in vitro* geralmente apresentam caules mais curtos e delgados, redução de tecidos de suporte, maior conteúdo de água nas células e pequena capacidade fotossintética. As raízes *in vitro* são fracas e pouco funcionais, e é desejável que se

desenvolvam o mais rapidamente possível. Porém, isso somente ocorrerá se a planta for mantida com baixa transpiração (PIERIK, 1990).

Outro aspecto importante é que o aprimoramento do processo de aclimatização envolve suprimentos adequados de nutrientes, como o uso de substratos compatíveis a ocasião (CATUNDA, 2004).

2.4.1 Substrato

Entre as principais características desejáveis de um substrato, pode-se citar a porosidade, retenção da umidade, a densidade e a disponibilidade de nutrientes para a planta (MEEROW, 1995). O substrato deve garantir, por meio de sua fase sólida, a manutenção mecânica do sistema radicular e assegurar um balanço correto de água-ar, além de nutrientes. Deve ainda estar isento de elementos minerais ou qualquer outra substância em concentração fitotóxica, assim como de fitopatógenos, pragas e plantas indesejáveis (VAVRINA *et al.*, 1996).

Na escolha do substrato, devem ser levadas em conta também as suas características físicas e químicas, que devem ser adequadas à espécie a ser plantada, além dos aspectos econômicos, tais como baixo custo e disponibilidade (FONSECA, 2001). Dificilmente se encontra um material com todas as características para atender as condições para o ótimo crescimento e desenvolvimento das plantas (SOUZA *et al.*, 1995). De modo geral, observa-se que diferentes tipos de resíduos agroindustriais vêm sendo progressivamente aplicados como substrato, visando oferecer alternativas para produtores de mudas e minimizando o impacto ambiental provocado pelos resíduos sólidos gerados (ROSA *et al.*, 2002).

A utilização da fibra de coco como substrato pode ser uma alternativa que garante uma maior sustentabilidade do processo de produção, uma vez que proporciona o aproveitamento de resíduos da agroindústria. A fibra de coco é derivada do processamento de cascas de coco maduro, da espécie *Cocos nucifera*, a principal palmeira comercializada no mundo e muito utilizada para projetos paisagísticos (ASSIS *et al.*, 2005).

Bataglia e Fulani (2010) relataram que a fibra de coco proporciona uma boa capacidade de aeração e ao mesmo tempo maior retenção de água, mas pouca capacidade de retenção de nutrientes. Maciel (2011) ao comparar o substrato comercial Plantmax® com fibra de coco, Plantmax® + areia, e com fibra de coco + areia, observou que o substrato proporcionou maior porcentagem de conversão de embriões somáticos de café em plântulas durante o processo de aclimatização. No entanto, não existem relatos de trabalhos em que se avaliou o uso de fibra de

coco como substrato na aclimatização de plântulas de café provenientes do cultivo *in vitro* de embriões.

O substrato Tropstrato® é largamente utilizado na aclimatização de plântulas oriundas da micropropagação, ele é composto de vermiculita expandida e materiais orgânicos de origem vegetal como a casca de *pinus*. Além disso, é livre de pragas, doenças e plantas invasoras (HOFFMANN, 1999). Alguns trabalhos utilizaram o substrato Tropstrato® e relataram excelentes resultados em termos de pegamento e crescimento das mudas propagadas *in vitro* (RODRIGUES *et al.*, 2005, ZEMKE *et al.*, 2003, PEREIRA *et al.*, 2007). Hoffmann (1999) constatou que o crescimento de plântulas após a emissão de raízes adventícias é favorecido pelas características físicas e químicas do substrato.

Com isso, a grande finalidade de um substrato é produzir uma planta (ou muda) de alta qualidade, em menor tempo e a baixo custo (ABREU; ABREU; BATAGLIA, 2002). Mas poucas pesquisas foram realizadas especificamente para a adaptação gradativa de culturas *in vitro* de embriões zigóticos de café.

Por essa razão, estudos para superar dificuldades de adaptação dessas plântulas, como determinação de substrato e ambientes que minimizem os impactos do cultivo para a fase de aclimatização são necessários, pela problemática adaptação às condições *ex vitro*.

2.4.2 Luminosidade

Em geral, plântulas *in vitro* requerem baixa luminosidade relativa, e quando submetidas ao aumento de luz, sofrem um processo de destruição das moléculas de clorofila, tornando-se cloróticas e queimadas. Isso ocorre pelo pequeno desenvolvimento das plantas *in vitro* e a baixa atividade fotossintética, pois todo o seu aparato fotossintético é adaptado a um ambiente com menor luminosidade (PAIVA; PAIVA, 2001). Para evitar esses problemas, as plântulas podem ser transferidas gradualmente, para uma intensidade de luz sob a qual manterá seu crescimento.

As características do ambiente de aclimatização possuem grande influência na adaptação e sobrevivência das mudas, sendo o nível de sombreamento, temperatura e umidade do ar, fundamentais para o sucesso da técnica. Além disso, mudas de café oriundas de sementes, são geralmente produzidas em viveiros na presença de sombrite, devido a grande sensibilidade a radiação solar direta (ASSIS *et al.*, 2019; BRAUN *et al.*, 2007; DARDENGO *et al.*, 2013). Essa característica da planta de café pode ser explicada devido a sua origem em ambientes sombreados nas florestas da África (FAHL *et al.*, 1994).

As mudas de café produzidas por meio da cultura de tecidos também precisam de sombreamento, uma vez que são mais frágeis quando comparadas às mudas produzidas por sementes. Santos *et al.* (2014), ao estudarem o processo de aclimatização de mudas de *C. canephora* oriundas do cultivo *in vitro*, constataram uma maior sobrevivência de plantas sob nível de sombreamento de 50% quando comparado com o de 30%.

Além do sombrite, existem outras formas de fazer o controle da luminosidade, como por meio de lâmpadas com diferentes comprimentos de ondas, telados com diferentes cores ou câmaras de crescimento vegetal (ASSIS *et al.*, 2019; COOLEY *et al.*, 2000; COOPER, 1967; COSTA *et al.*, 2019).

Apesar da maioria das lavouras de café no Brasil ser cultivada a pleno sol, estudos apontam essa espécie como uma planta de sombra, especialmente na fase de muda (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

2.4.3 Temperatura e umidade

A manutenção da alta umidade relativa, por alguns dias após o transplântio da plântula *in vitro* em meio de cultura para um substrato, é considerada como ponto crítico para a sobrevivência das plântulas. Um número significativo de laboratórios comerciais tem evitado o uso de um sistema automático de irrigação para este propósito, por tornar o meio excessivamente úmido, favorecendo o crescimento de fungos e algas. O sistema preferencial é o *fogging* ou nebulização, que pode evitar muitos dos problemas encontrados com sistemas de irrigação (PAIVA; PAIVA, 2001).

Segundo DaMatta e Ramalho (2006), o valor adequado da temperatura varia com o estágio fenológico do café. A temperatura ideal para a germinação do café arábica é entre 30 e 32 °C, quando leva cerca de três semanas para concluir o processo. Temperaturas acima ou abaixo desse valor podem inibir a germinação das sementes dessa espécie (BARROS *et al.*, 1999).

Durante as primeiras semanas de desenvolvimento da planta, a temperatura ideal é de cerca de 30/23 °C (dia/noite), mas com a produção dos primeiros ramos, os valores diminuem para 26/20 °C e aproximadamente após um ano, eles se aproximam dos indicados para plantas maduras (MORAES, 1963; IARC, 1991; COSTE, 1992; BARROS *et al.*, 1999). Além disso, para o desenvolvimento adequado das raízes, 24-27 °C parece ser a melhor faixa de temperatura do solo (IBC, 1985). Entretanto, de acordo com Paiva e Paiva (2001), a temperatura do ar no

qual as plântulas devem ser mantidas durante a fase de aclimatização, deve estar na faixa entre 13 e 30 °C, porém, é determinada, primeiramente, pela espécie da planta em questão.

Em vários estudos envolvendo a aclimatização de plântulas de café provenientes da cultura de tecidos de embriões somáticos, a temperatura da câmara de crescimento empregada foi a de 25° C (CARVALHO *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2016). Santos *et al.* (2014), aclimatizaram plântulas de café em casa de vegetação, em que foram registradas temperaturas médias mínimas de 22 °C e temperaturas máximas de 32 °C. Santana-Buzzy *et al.* (2007) desenvolveram um protocolo para a aclimatização de plântulas de café e estabeleceram a temperatura ideal entre 25 e 28 °C.

No entanto, apesar de vários estudos a respeito da temperatura ideal para plântulas de café provenientes de sementes e de culturas de tecidos, poucos estudos foram feitos a respeito de diferentes substratos utilizados e do ambiente ideal para o desenvolvimento das mudas oriundas de embriões zigóticos de café.

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 Agrônomo, 2002. p. 17-28. (Documentos IAC, 70).
- ALMEIDA, G. R. R. *et al.* Comportamento de cafeeiros propagados por embriogênese somática e por sementes em diferentes níveis de água no solo. **Coffee Science**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 114-119, maio/ago. 2011
- ALVES, J. D.; GUIMARÃES, R. J. Sintomas de desordens fisiológicas em cafeeiro. *In*: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p. 169-215.
- ASSIS, A. M. *et al.* Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 255-260, 2005.
- ASSIS B. P., et al. Growth response of four conilon coffee varieties (*Coffea canephora* Pierre ex a. froehner) to different shading levels. **Journal of Agricultural Science**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2019.
- BATAGLIA, O. C.; FURLANI, P. R. Adubação. *In*: MATHES, L. A. F.; UZZO, R. P. (orgs.). **Palmeiras Ornamentais: produção e cultivo**. Campinas: Fundag, 2010. p. 43-47.
- BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; RENA, A. B. Physiology of growth and production of the coffee tree - a review. **J. Coffee Res.**, [s. l.], v. 27, p. 1-54, 1999.
- BENDAÑA, F. E. Fisiología de los semillos de café I. Problemas relativos al almacenamiento. **Turrialba**, Costa Rica, v. 4, n. 15, p. 93-96, 1962.
- BRAUN, H. *et al.* Produção de mudas de café conilon propagadas vegetativamente em diferentes níveis de sombreamento. **Idesia (Arica)**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 85-91, dez. 2007.
- CAMARGO, A. P. O clima e a cafeicultura no Brasil. **Inf. Agropec.**, [s. l.], v. 11, p. 13-26. 1985.
- CAMPINHOS JUNIOR, E.; IKEMORI, Y.; MARTINS, F. Determinação do meio de crescimento mais adequado à formação de mudas de *Eucalyptus* spp. (estaca e semente) e *Pinus* spp.(semente) em recipientes plásticos rígidos. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, Curitiba. **Anais [...]** Curitiba: I.F.P./IUFRO, 1984. p. 350-365.
- CARVAJAL, J. F. **Cafeto - Cultivo y Fertilización**. Berna, Suiza: Instituto Internacional de La Potassa, 1984.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J.; CARVALHO, G. R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas in vitro. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, 1999.

CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café**. Brasília: EMBRAPA, 2007. 247 p.

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

COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.

COLLINS, G. B.; GROSSER, J. W. Culture of embryos. *In*: VASIL, I. K. (ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v.1, p. 241- 57.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Safra 2019 - Quarto levantamento, dezembro 2019. Brasília: CONAB, 2019. v. 5. n. 4. p. 1-65.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Safra 2019 – Primeiro levantamento, janeiro 2020. Brasília: CONAB, 2020. v. 6, n. 1, p. 1-65, 2020.

COOLEY, N. M., et al. Outdoor ultraviolet polychromatic action spectra for growth responses of *Bellis perennis* and *Cynosurus cristatus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 59, n. 1-3, p. 64-71, 2000.

COOPER, C. S. Relative growth of alfalfa and *Birdsfoot trefoil* seedlings under low light intensity 1. **Crop Science**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 176-8, 1967.

COSTA A. F. *et al.* Efeito da qualidade de luz no desenvolvimento da moringa sob telados de diferentes cores. **Revista Internacional de Ciências**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 103-14, set. 2019.

COSTE, R. **Coffee - The Plant and the Product**. London: MacMillan Press, 1992.

DA MATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 55-81, 2006.

DARDENGO, M. C., et al. Crescimento e qualidade de mudas de café conilon produzidas em diferentes recipientes e níveis de sombreamento. 2013.

DEBERGH, P. C. Aclimatization techniques of plants from in vitro. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 291-300, 1991.

DUSSERT, S. *et al.* Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, Poznan, v. 127, p. 192-204, 2006.

DUSSERT, S. *et al.* Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 119, n. 4, p. 534-543, 2003.

FAHL, J. I. *et al.* Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). **Journal of Horticultural Science**, [s.l.], v. 9, n. n. 69. p. 161-169, jan. 1994.

FERREIRA, A. G.; HU, C.Y. Cultura de Embriões. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 371-393.

FIGUEIREDO, M. A. de. **Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L. visando à criopreservação**. 2016. 198 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.

FONSECA, T. G. **Produção de mudas de hortaliças em substratos de diferentes composições com adição de CO₂ na água de irrigação**. 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2001.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. *In*: _____; *Pratice*. 2nd. ed. Edington: Exegectis, 1996. 1361 p. Part 2.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-170.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material didático de apoio à disciplina de biotecnologia**, Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

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, MG, 1999.

IARC. International Agency for Research on Cancer. *Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal*. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization, Lyon, France, 1991. v. 51.

IBC. Instituto Brasileiro do Café. **Cultura do Café no Brasil - Manual de Recomendações**. Rio de Janeiro: IBC; G.E.R.C.A., 1985.

ILLG, R. D. Metodologia de seleção *in vitro* para resistência a fatores causadores de estresse. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1. 1985, Brasília. **Anais [...]**. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p. 45-47.

MACIEL, A. L. R. **Micropropagação do cafeeiro por embriogênese somática via biorreator de imersão temporária**. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2011.

MACIEL, A. L. R. et al. Acclimatization of coffee ('*Coffea racemosa*'x'*Coffea arabica*') somaclones obtained from temporary immersion bioreactor system (RITA). **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 169, 2016.

- MELO, B. D. **Estudos sobre produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Uninversidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1999.
- MEEROW, A. W. Growth of two tropical foliage plants using coir dust as a container medium amendment. **Hort Technology**, Alexandria, n. 5, p. 237-239, 1995.
- MORAES, F. R. Meio ambiente e práticas culturais. *In*: Cultura e Adubação do Cafeeiro. São Paulo: Instituto Brasileiro da Potassa, 1963. p. 77-126.
- MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 30, p. 875-879, 2006.
- PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. **Cultura de Tecidos**. Lavras: UFLA FAEPE, 2001. 97 p.: il.
- PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 80 p.
- PEREIRA, C. E. et al. Determinação de inibidores da germinação no endosperma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 306-311, 2002.
- 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, mar./abr. 2007.
- PEREIRA, C. C. Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café. 2017. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2017.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones MudiPrensa, 1990. 326 p.
- PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.
- PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 380-389, Aug. 2016.
- RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. *In*: RENA, A. B. et al. **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1986. p. 13-85.
- RODRIGUES, P. H. V. *et al.* Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 299-301, 2005.
- ROSA, S. D. V. F. *et al.* Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.38, n.2, p.421-431, 2010.
- ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. S.; ABREU, F. A. P.; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R.V. **Utilização de coco como substrato agrícola**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 24 p.

ROSA, S. D. V. F. *et al.* Cafeína exógena inibe o desenvolvimento *In Vitro* de embriões de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28., 2002, Caxambu. **Anais** [...] Caxambu, 2003. p. 164-166.

SANTOS, M. R. A. *et al.* Aclimatização de mudas micropropagadas de *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology and Biology**, v. 5, n. 1, p. 12-19, 2014.

SANTANA-BUZZY, N. *et al.* Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 43, n. 6, p. 507-520, 2007.

SILVEIRA, E. B.; RODRIGUES, V. J. L. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, L. R. L.; MESQUITA, J. C. P. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 211-216, 2002.

SOUZA, F. F. *et al.* **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho, 2003. 23 p.

SOUZA, M. M. *et al.* Avaliação de substratos para o cultivo de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat., compositae) 'white polaris' em vasos. **Revista Brasileira de Horticultura e Ornamental**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 71-77, 1995.

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, nov. 2003.

VÁLIO, I. F. M. Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v. 5, n. 1, p. 32-39, 1980.

VAVRINA, C. S.; ARMBRESTER, K.; ARENAS, M.; PENA, M. **Coconut coir as an alternative to peat media for vegetable transplant production**. SSWFREC Station Rpt.-VEG, 1996.

CAPÍTULO 2 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CAFÉ PROVENIENTES DE SEMENTES RECÉM COLHIDAS E SEMENTES ENVELHECIDAS

RESUMO

O café é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, e só no ano de 2019, houve um aumento de 1,3 mil hectares de lavouras novas instaladas no país. Para a implantação e renovação de lavouras, é necessário a utilização de sementes com elevado desempenho germinativo e alta qualidade fisiológica, para a obtenção de mudas saudáveis. No entanto, sementes de café apresentam rápida perda de viabilidade e, sendo o endosperma mais sensível a deterioração, a retirada do embrião da semente e seu cultivo *in vitro* poderia eliminar esse problema. Com isso, este estudo teve como objetivo avaliar a germinação e o crescimento de embriões zigóticos de café oriundos de sementes recém-colhidas e sementes submetidas ao envelhecimento acelerado. Para a realização do envelhecimento, parte das sementes foi colocada em telados sobre o gerbox, contendo 40 ml de água destilada em seu interior, e colocados em BOD a 42 °C durante 6 dias. As sementes envelhecidas foram inicialmente avaliadas pelo teste de germinação, juntamente com as sementes recém-colhidas. Logo após o envelhecimento, os embriões das sementes envelhecidas e recém-colhidas foram extraídos em câmara de fluxo laminar e inoculados em meios de cultura MS. Após 60 e 120 dias da inoculação dos embriões, foi avaliada a porcentagem de plântulas anormais e mortas. Além disso, foram também realizadas as avaliações de altura (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas formadas e matéria seca de plântulas (mg) das plântulas normais. O experimento foi realizado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizados, sendo oito repetições de 40 embriões cada. Foi utilizado esquema fatorial 2 x 2, duas qualidades de sementes (recém-colhida e envelhecida) x dois tempos de cultivo (aos 60 e aos 120 dias). As sementes envelhecidas obtiveram um percentual menor (52%) no teste de germinação do que as de sementes recém colhidas (95%). Os embriões de sementes envelhecidas apresentaram menor sobrevivência de plântulas normais, porém, ainda assim foi alta (86%). Apesar disso, não ocorreram diferenças estatísticas significativas no número de plântulas anormais, mortas e nos parâmetros de crescimento, entre as sementes com diferentes qualidades. O percentual de plântulas anormais foi maior aos 120 dias que aos 60 dias da inoculação. Portanto, a excisão de embriões zigóticos de sementes e seu cultivo *in vitro* por 60 dias, possibilita a formação de plântulas normais a partir de sementes envelhecidas e o período *in vitro*, 120 dias, pode ocasionar anormalidades.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Cultura de embriões. Plântulas. Germinação. Vigor.

ABSTRACT

Coffee is one of the main agricultural products in Brazil, in 2019 there was an increase of 1.3 thousand hectares of new crops installed in the country. For the implantation and crops renovation, it is necessary to use seeds with high germinates performance and high physiological quality, to obtain healthy seedlings. However, coffee seeds show rapid loss of viability and, the endosperm is more sensitive to deterioration, so the removal of the embryo from the seed and its cultivation *in vitro* could eliminate this problem. Thus, this study aimed to evaluate the germination and growth of zygotic coffee embryos from freshly harvested seeds and seeds submitted to accelerated aging. The aged seeds were initially evaluated by the germination test together with the freshly harvested seeds. To perform aging, part of the seeds were placed on screens over the gerbox, containing 40 ml of distilled water inside, and placed in BOD at 42°C for 6 days. The the aged embryos and freshly harvested seeds were extracted in a laminar flow chamber and inoculated in MS culture media. After 60 and 120 days after embryo inoculation, the percentage of abnormal and dead seedlings was evaluated. In addition, height (cm), stem diameter (mm), number of leaves formed and seedling dry mass (mg) of normal seedlings were also evaluated. The experiment was carried out using a completely randomized design, with eight replications of 40 embryos each. A 2 x 2 factorial scheme, two seed qualities (freshly harvested and aged) x two growth times (at 60 and 120 days) was used. The aged seeds obtained a lower percentage (52%) in the germination test than those of freshly harvested seeds (95%). The aged seed embryos showed less survival than normal seedlings, but it was still high (86%). Despite this, there were no statistically significant differences in the number of abnormal, dead plants and in the growth parameters in the different seed qualities. The percentage of abnormal seedlings was higher at 120 days than at 60 days of inoculation. Therefore, the excision of zygotic embryos from seeds and their cultivation *in vitro* for 60 days allows the formation of normal seedlings from aged seeds and the longest time *in vitro*, 120 days, can cause abnormalities.

Keywords: *Coffea arabica* L. Embryo culture. Seedlings. Germination. Vigor.

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas do país, e tanto para a implantação quanto para a renovação das lavouras de *C. arabica* L. são utilizadas mudas provenientes de sementes. Desta forma, a utilização de sementes com elevado desempenho germinativo e alta qualidade fisiológica é considerada como um dos principais fatores na obtenção de mudas vigorosas no campo, e, posteriormente, maior produtividade da lavoura (ROSA *et al.*, 2007).

No entanto, sementes de café apresentam algumas limitações, pois perdem a sua viabilidade em poucos meses, além de terem germinação lenta e desuniforme. Essa dificuldade de armazenamento das sementes por períodos prolongados conflita também no estabelecimento das mudas em campo, pois, podem ficar aptas ao plantio em épocas não favoráveis, como em períodos de escassez de chuvas (THOMAZIELLO, 2000).

Um dos fatores que pode ter interferência na viabilidade das sementes de café armazenadas é a deterioração do endosperma, proporcionando a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e substâncias fenólicas que podem prejudicar a germinação e o desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, a formação da plântula (DUSSET *et al.*, 2006). Então, a retirada do embrião da semente e seu cultivo *in vitro* poderia eliminar o problema da oxidação por esses tipos de compostos liberados pelo endosperma.

Os eixos embrionários constituem bons explantes para a aplicação da técnica de cultivo *in vitro*, visto que apresentam variabilidade genética necessária para os programas de melhoramento (SANTANA-BUZZY *et al.*, 2007) e os tecidos que formam o eixo são mais tenros e possuem germinação mais uniforme e rápida em relação às sementes. Além disso, a cultura *in vitro* dos embriões pode propiciar a produção de mudas em períodos mais adequados do ano.

A cultura *in vitro* de embriões zigóticos de café a partir de sementes envelhecidas ainda é pouco estudada, e isso poderia possibilitar a formação de mudas saudáveis a partir de sementes armazenadas que apresentam baixo vigor. Com isso, objetivou-se com este trabalho avaliar a germinação e o crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de café oriundos de sementes envelhecidas e recém-colhidas, avaliando-se o potencial para geração de mudas saudáveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e material vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura, e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes da safra 2017, da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62.

2.2 Colheita, seleção e processamento das sementes

Os frutos de café foram colhidos na Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha, MG. Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Após a colheita dos frutos, esses foram lavados para a separação de frutos chochos, malformados e muito danificados por brocas, além de impurezas, antes de serem despolpados mecanicamente. As sementes foram desmuciladas por fermentação em água, em temperatura de 30 °C, por 24 horas e, em seguida, foram lavadas em água corrente e submetidas a secagem à sombra, em peneiras, para a retirada da umidade superficial. Após esses processos, as sementes foram secadas em secador estacionário a 25 °C. A temperatura da massa de sementes foi monitorada com termômetro de mercúrio e as sementes reviradas a cada 1h até atingirem um teor de água de 12%.

A determinação do teor de água inicial das sementes foi realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes.

As sementes foram armazenadas em câmara fria, com temperatura de 10 °C e UR de 55%, em sacos plásticos, até a realização dos testes, quando foram homogeneizadas e tiveram os pergaminhos retirados manualmente.

2.3 Obtenção dos lotes de sementes

Foram utilizados dois lotes de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, sendo um de melhor qualidade, constituído de sementes recém colhidas e o outro de mais baixa qualidade, obtidos pelo envelhecimento acelerado das sementes.

A técnica do envelhecimento acelerado (DELOUCHE, 1965) consiste em colocar as sementes em uma camada única e uniforme sobre telado, no interior de caixas plásticas, do tipo gerbox contendo 40 mL de água e manter em temperatura de 42 °C, em BOD, por seis dias. As sementes recém-colhidas também foram colocadas sobre telados de caixas do tipo gerbox contendo 40 mL de água destilada, em BOD a uma temperatura de 25 °C, por seis dias para umedecimento e padronização da umidade dos níveis de qualidade.

2.4 Assepsia das sementes

Antes da extração dos embriões, as sementes passaram por um processo de assepsia, sendo embebidas em formaldeído por 20 minutos em agitação, lavadas três vezes com água destilada e autoclavada e colocadas para embeber em ácido bórico a 0.5% em agitação por 72 horas. O ácido bórico tem diversas propriedades, desde micronutriente essencial para as plantas, antisséptico, bacteriostático, controle de bactérias, algas, fungos e insetos, e controle da biodeterioração (LLOYD, 1998). Também, segundo Freitas *et al.* (2016) e Pereira (2017), o ácido bórico promove um maior amolecimento das sementes, auxiliando assim, o processo de retirada do embrião.

Antes da extração dos embriões, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

2.5 Extração e cultura *in vitro* dos embriões

Somente para as sementes em que foram extraídos os embriões, realizou-se a assepsia das sementes. Os embriões foram extraídos em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog, mais conhecido como saís (micro e macro nutrientes MS (MURASSHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121 °C durante 20 minutos. Foram inoculados oito blocos de 40 embriões em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura, os quais foram mantidas em BOD com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C, durante 60 ou 120 dias.

Os tempos de crescimento *in vitro* foram definidos com base em que somente aos 60 dias as plátulas apresentavam folhas verdadeiras, porém, ainda estavam com tamanho muito reduzido, então escolhemos também o tempo de 120 dias, onde se observou um incremento em altura, número de folhas e tamanho de raízes.

Aos 60 dias e aos 120 dias, as plântulas foram avaliadas por meio da porcentagem de plântulas normais, anormais, mortas, altura de plântulas, diâmetro do caule e número de folhas. Os resultados das avaliações de plântulas cultivadas por 120 dias apresentaram maior número de anormalidades e, assim, apenas as de 60 dias de cultivo foram utilizadas para os estudos de aclimatação.

2.6 Avaliações

2.6.1 Teste de germinação das sementes

As sementes dos lotes com diferentes níveis de qualidade, recém-colhidas e envelhecidas, foram avaliadas por meio do teste de germinação. Para isso, quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento, foram semeadas em papel de germinação umedecidos com água destilada, na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Os rolos de germinação foram acondicionados em germinador, regulado a 30 °C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram realizadas avaliações aos 15, 30 e 45 dias.

Aos 15 dias foi determinada a porcentagem de protrusão radicular. Aos 30 dias da semeadura foi determinada a porcentagem de plântulas normais, sendo consideradas como plântulas normais, aquelas que apresentavam raiz principal e pelo menos duas raízes laterais saudáveis e bem formadas. Após 45 dias da semeadura, foi computada a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas. Para a avaliação de matéria seca, as plântulas normais aos 45 dias tiveram suas partes aéreas separadas das raízes, com auxílio de um bisturi, e o material vegetal colocado em sacos de papel e submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 3 dias, até peso constante. A matéria seca foi determinada em balança de precisão, sendo os resultados expressos em gramas/plântula.

2.6.2 Germinação *in vitro*

Após 60 e 120 dias da inoculação dos embriões, foram avaliadas a porcentagem de germinação dos eixos embrionários, plântulas normais, porcentagem de plântulas anormais e embriões mortos. Para serem consideradas plântulas normais, os eixos embrionários deveriam apresentar folhas cotiledonares e uma raiz principal. Foram considerados anormais aqueles embriões que não apresentavam protrusão radicular, formação de cotilédones, ou má formação,

e geotropismo invertido (raízes para cima e cotilédones para baixo), e foram consideradas mortas as plântulas e embriões que apresentavam coloração marrom.

2.6.3 Análise de crescimento

Foram realizadas avaliações de diâmetro do caule (mm) e altura (cm) e número de folhas aos 60 e 120 dias após a inoculação dos embriões. O diâmetro na altura do colo foi medido com paquímetro (precisão de 0,05 cm) e a altura com régua graduada, tomando-se como padrão a gema terminal (meristema apical). Para a contagem do número de folhas, foram contabilizadas somente as folhas completamente expandidas.

Para a matéria seca das plântulas, elas foram colocadas em sacos de papel devidamente identificados e, posteriormente, foram alocadas em estufa a 70 °C por um período de aproximadamente 72 horas (até adquirirem peso constante). A determinação do peso da matéria seca foi feita em balança digital de precisão.

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

No teste de germinação das sementes foi utilizado o delineamento inteiramente casualizados (DIC), com quatro repetições de 25 sementes. A cultura de embriões também foi realizada em DIC, divididos em oito repetições de 40 embriões cada, em esquema fatorial 2 x 2, dois lotes de sementes (recém colhidas e envelhecidas) x dois tempos de avaliação (aos 60 e aos 120 dias da inoculação dos embriões em meio de cultura). Para as avaliações de altura e diâmetro do caule de plântulas e número de folhas, foram utilizadas 8 repetições de 20 plântulas. Todos os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o *software* estatístico SISVAR (FERREIRA, 2019) e as médias avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Qualidade das sementes dos lotes utilizados

De acordo com a análise de variância (ANEXO) dos resultados do teste de germinação das sementes, houve efeito significativo do nível de qualidade das sementes, ou seja, diferença estatística entre as sementes que passaram pela metodologia do envelhecimento acelerado e as sementes recém-colhidas. As sementes envelhecidas apresentaram menor desempenho fisiológico em todas as variáveis analisadas, demonstrando que o processo de envelhecimento acelerado proporcionou perda da qualidade das sementes, se comparada àquelas que não passaram por esse estresse, ou seja, sementes recém-colhidas (TABELA 1).

Tabela 1 - Porcentagem de protrusão radicular, germinação, folhas cotiledonares expandidas e matéria seca de plântulas, oriundas de sementes recém-colhidas e sementes que passaram pelo envelhecimento acelerado.

Lote de semente	Protrusão radicular (%)	Germinação (%)	Plântulas com folhas cotiledonares expandidas (%)	Matéria seca da parte aérea (mg)	Matéria seca de raiz (mg)
Recém-colhida	98 a	95 a	90 a	0,167 a	0,144 a
Envelhecida	75 b	52 b	48 b	0,078 b	0,066 b
CV	7,73	16,74	21,3	23,17	25

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), o tempo de exposição das sementes às condições do teste de envelhecimento artificial causa aumento da umidade e, conseqüentemente, aumento da temperatura das sementes e dos processos respiratórios, favorecendo também maior atividade de microrganismos. Isso resulta em uma maior deterioração das sementes em comparação com as não envelhecidas.

Fantazzini *et al.* (2018) relacionaram os tempos do envelhecimento acelerado com o tempo de armazenamento das sementes de café e obtiveram resultados de correlação positiva entre esses fatores. As sementes que passaram por envelhecimento acelerado durante quatro dias, apresentaram germinação estatisticamente igual àquelas sementes armazenadas por dois meses em sacos de papel trifoliado, em condição não controlada.

No presente estudo, obteve-se redução de 43% na germinação com o envelhecimento acelerado das sementes de café, ou seja, de 95% de germinação antes, para 52% após o

procedimento. Isso demonstra a eficiência da técnica em se obter sementes com um padrão de qualidade inferior àquelas que não passaram por esse processo, sendo, portanto, um método que reproduz eficientemente a perda de viabilidade natural ocorrida em sementes de café armazenadas.

Além dos danos causados pelo envelhecimento das sementes, a alta umidade, somada às temperaturas mais elevadas, contribui para a elevação da incidência de patógenos nas sementes (BRACCINI *et al.*, 2008), podendo causar a deterioração e até a morte das mesmas, dificultando a avaliação do teste de germinação, e comprometendo consideravelmente a germinação e a formação de mudas (CLEMENTE *et al.*, 2011).

De acordo com Silva *et al.* (2010), o envelhecimento acelerado tem sido regularmente utilizado em programas de controle de qualidade adotados pelas empresas de sementes, pois, fornece, em apenas alguns dias, informações confiáveis sobre o potencial de armazenamento dos lotes produzidos. Além disso, Camargo *et al.* (2000), Freitas *et al.* (2006) e Santos e Paula (2007) afirmaram que existe também uma correlação entre o envelhecimento natural e artificial de sementes de diferentes espécies, como as de *Eucalyptus grandis*, *Gossypium hirsutum* e *Sebastiania commersoniana*.

3.2 Germinação *in vitro*

De acordo com a análise de variância (ANEXO) dos resultados do teste de germinação *in vitro* dos embriões zigóticos retirados das sementes de café, não houve interação significativa entre os fatores nível de qualidade das sementes (recém-colhidas e envelhecidas artificialmente) e o tempo de crescimento *in vitro* (60 e 120 dias da inoculação dos embriões em meio de cultura), para as variáveis plântulas normais, plântulas anormais, altura, diâmetro do caule e número de folhas das plântulas. Houve efeito significativo dos fatores isolados, qualidade das sementes e dias após a inoculação (FIGURA 1). No entanto, não houve diferenças estatísticas para o número de plântulas mortas, nem para as qualidades das sementes e nem para o tempo de crescimento *in vitro*.

Figura 1 - Dados médios de plântulas normais (A), plântulas anormais (B), altura de plântulas (C), diâmetro do caule (D) e número de folhas (E), de embriões zigóticos de café cultivados *in vitro*, provenientes de sementes recém-colhidas e envelhecidas. (continua...).

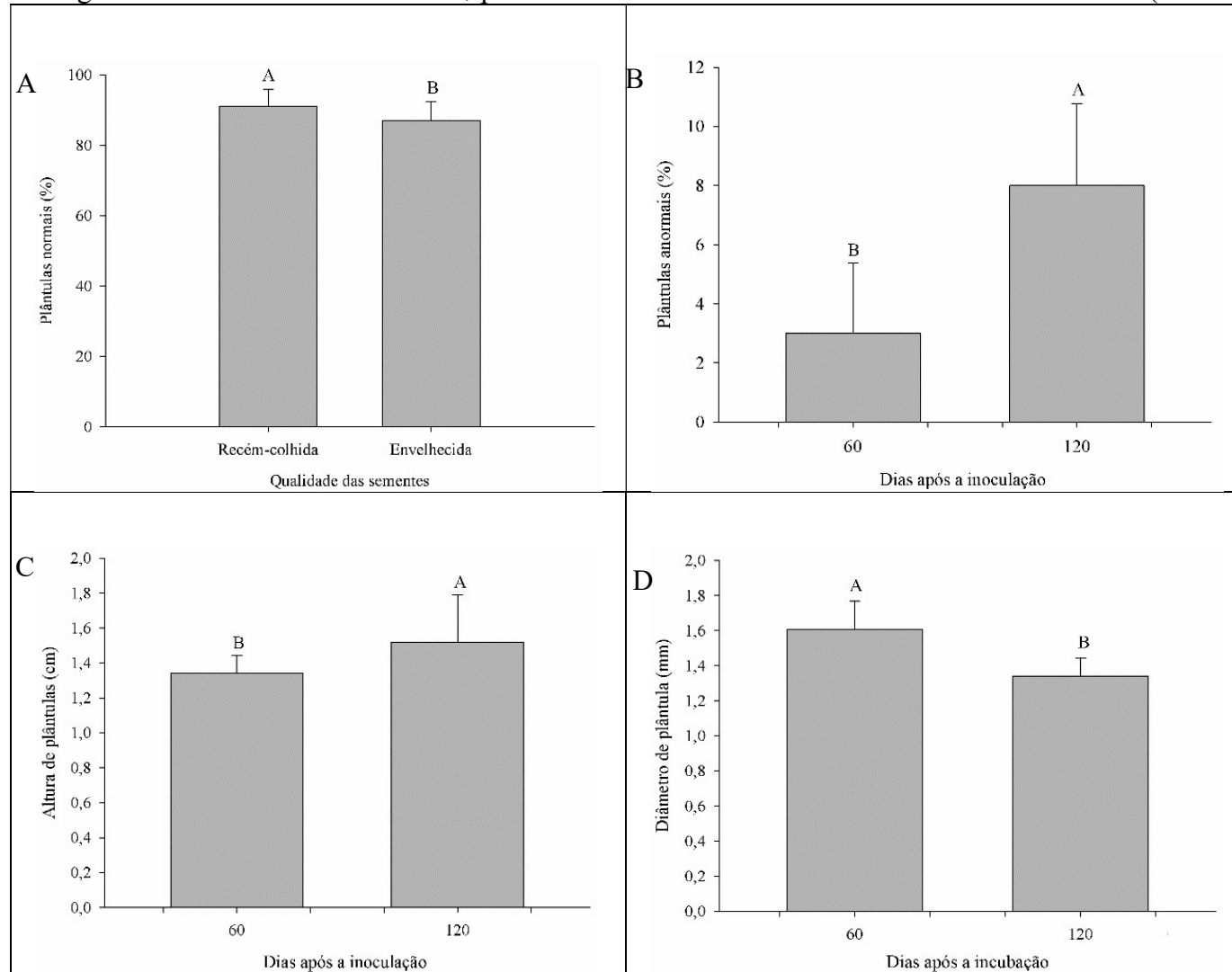
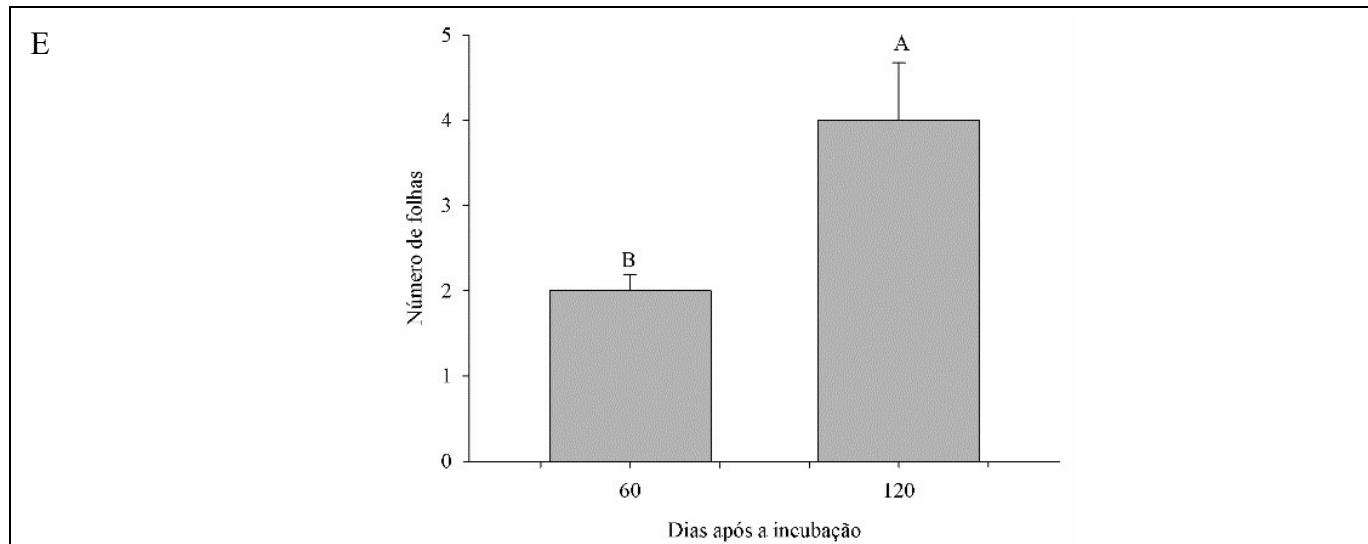


Figura 1 - Dados médios de plântulas normais (A), plântulas anormais (B), altura de plântulas (C), diâmetro do caule (D) e número de folhas (E), de embriões zigóticos de café cultivados *in vitro*, provenientes de sementes recém-colhidas e envelhecidas. (conclusão).



Fonte: Da autora (2020).

Para o resultado da análise de plântulas normais, apenas o fator qualidade de sementes foi significativo, como mostra a Figura 1. As plântulas oriundas das sementes envelhecidas obtiveram uma menor porcentagem de plântulas normais (86%) que aquelas vindas de sementes recém colhidas (92%) (FIGURA 1A). Entretanto, a diferença entre esses dois tratamentos foi pequena. A média de 86% de plântulas normais obtidas das sementes envelhecidas é um resultado significativo, uma vez que alcança a porcentagem mínima estabelecida para germinação em um lote de sementes de café (MAPA, 2012).

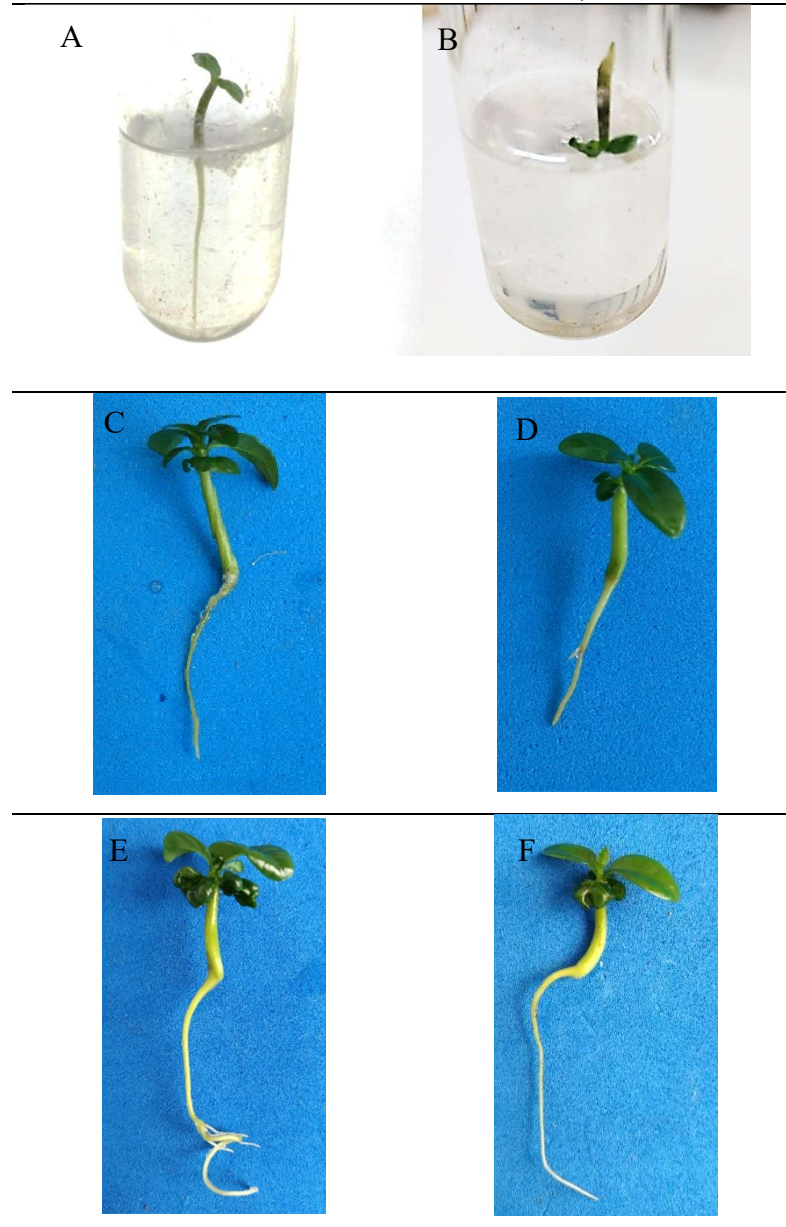
Já para as variáveis porcentagem de plântulas anormais, altura, diâmetro do caule e número de folhas das plântulas, apenas o fator dias após a inoculação foi significativo (FIGURA 1). Não apresentando diferenças entre as qualidades das sementes. Observa-se que o número de plantas anormais aumentou com o tempo, indicando que, quanto maior o tempo que o embrião permanece na cultura *in vitro*, maior a possibilidade de ocorrerem anomalias nas plântulas de café (FIGURA 1B).

Quanto ao crescimento das plântulas, medidas pela variável altura aos 120 dias, as plântulas de café obtiveram maiores valores quando comparado aos 60 dias, o que já era de se esperar, uma vez que os embriões permaneceram por mais tempo em contato com o meio de cultura (FIGURA 1C).

Já com a variável diâmetro do caule das plântulas, ocorreu uma diminuição dos valores com o aumento do tempo de crescimento *in vitro* (FIGURA 1D). Isso pode ter ocorrido pela remobilização das reservas energéticas para outros locais de crescimento, como, por exemplo, as folhas. O número de folhas das plântulas foi maior aos 120 dias (FIGURA 1E).

Na Figura 2 são apresentadas fotos ilustrativas das plântulas avaliadas durante o período de desenvolvimento *in vitro* dos embriões excisados das sementes recém-colhidas, de melhor qualidade fisiológica, e as de sementes submetidas ao envelhecimento acelerado. As Figuras 2A e 2B ilustram plântulas com trinta dias da inoculação em meio de cultura *in vitro*. A Figura 2A representa as plântulas que foram consideradas normais, que apresentavam pelo menos uma raiz principal e folhas. Já a Figura 2B, retrata uma plântula *in vitro* considerada anormal, pois apresentou geotropismo invertido, sendo que, nesse caso, as chances de se tornar uma muda normal e sadia são menores.

Figura 2 - (A) Plântula normal oriunda de embrião zigótico de *C. arabica* L., cultivado em meio de cultura; (B) Plântula anormal oriunda de embrião zigótico de *C. arabica* L. em contato com meio de cultura; (C) Plântula de café oriunda de sementes recém-colhidas, aos 60 dias; (D) Plântula de café oriunda de sementes envelhecidas, aos 60 dias; (E) Plântula de café oriunda de sementes recém-colhidas, aos 120 dias; (F) Plântula de café oriunda de sementes envelhecidas, aos 120 dias.



Fonte: Da autora (2020).

Na Figura 2 C e D, observa-se as plântulas com 60 dias de inoculação em meio de cultura, contendo todas as estruturas necessárias para o transplantio, como folhas e raízes. Nas plântulas com 60 dias, as sementes recém-colhidas (FIGURA 2C) e de sementes envelhecidas (FIGURA 2D), de forma geral, não apresentaram muitas diferenças entre si de acordo com os resultados das análises estatísticas (FIGURA 1 A). Já na Figura 2 E e F, estão representadas as

plântulas com 120 dias da inoculação em meio de cultura, podendo constatar certa diferença entre as plântulas com 60 dias, como no maior comprimento de raiz, porém, essa característica não foi medida no atual experimento.

No processo natural de deterioração de sementes armazenadas, ocorre a formação de radicais livres, que causam oxidação dos tecidos vegetais, resultando em danos às membranas celulares e na geração de subprodutos tóxicos (DUSSERT *et al.* 2006). Os danos oxidativos induzidos por radicais livres podem resultar na peroxidação de lipídeos da membrana, seguida da desintegração desta, levando à morte celular (BARREIROS *et al.*, 2006; HENDRY *et al.*, 1993).

No caso da metodologia do envelhecimento acelerado, quanto mais tempo as sementes são expostas às condições do teste, maior seu teor de umidade, ocasionando um aumento da temperatura das sementes devido aos mecanismos respiratórios e à maior atividade de microrganismos. Isso resulta em um aumento na deterioração das sementes, em comparação com as não envelhecidas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012)

No presente estudo, danos ao vigor das sementes podem ser evidenciados na menor porcentagem de germinação das sementes que passaram pelo processo de envelhecimento acelerado. Porém, quando retirado o embrião zigótico dessas sementes envelhecidas e cultivados em meio de cultura, estes se desenvolveram bem, formando plântulas normais, assim como as plântulas oriundas das sementes recém-colhidas, não submetidas ao envelhecimento acelerado.

Pereira (2017), estudando a formação de mudas de café a partir de sementes com baixos níveis de qualidade, constatou que é possível formar plântulas normais a partir do cultivo de embriões extraídos destas sementes, havendo fortes indícios de que os endospermas são mais sensíveis do que os embriões ao processo de deterioração (COELHO *et al.*, 2017).

Em pesquisa recente, Fantazzini *et al.* (2018) verificaram, ao comparar os dados do teste de tetrazólio com os de formação de plântulas normais de café, que houve melhor desempenho fisiológico dos embriões em comparação às sementes inteiras. Resultados de trabalhos de Dussert *et al.* (2006), também mostraram que ocorre maior sensibilidade dos endospermas à secagem e à baixas temperaturas, em comparação aos embriões zigóticos, evidenciando, mais uma vez, a maior sensibilidade do endosperma quando comparado aos embriões das sementes de café.

No estudo do comportamento das sementes de *C. arabica* L. submetidas à secagem rápida em sílica em gel e à secagem lenta em soluções salinas, Coelho *et al.* (2015) verificaram porcentagem de plântulas normais próximas de zero no teste de germinação de sementes

secadas até 5% de umidade. Entretanto, nessa mesma umidade, os embriões ainda apresentavam viabilidade, pelo teste de tetrazólio, indicando que os danos de secagem estão mais relacionados aos endospermas. Dussert e Engelmann (2006) e Figueiredo (2016) trabalhando com sementes de *C. arabica* L. criopreservadas, verificaram maior sensibilidade do endosperma ao resfriamento do que do embrião.

Com isso, tem sido confirmado que o endosperma é mais sensível ao processo de deterioração do que o embrião. Portanto, pode-se dizer que embriões zigóticos retirados de sementes envelhecidas de café cultivados em meio de cultura, apresentam desempenho similar ao de embriões de sementes recém-colhidas.

4 CONCLUSÕES

O cultivo *in vitro* por 60 dias se mostra mais vantajoso, pois as plântulas já apresentam todas as características necessárias para o transplante e com 120 dias tem-se o aumento do aparecimento de plântulas anormais.

A excisão do embrião zigóticos da semente e seu cultivo *in vitro* possibilita a obtenção alta porcentagem de germinação e formação de plântulas normais a partir de sementes envelhecidas.

REFERÊNCIAS

- BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.
- BRACCINI, A. L. *et al.* Conservação de sementes de café robusta (*Coffea canefora* Pierre ex Frochner) cultivar conillon em função do grau de umidade e do tipo de embalagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 160-169, maio 2008.
- CAMARGO, M. L. P.; MORI, E. S.; MELLO, E. J.; ODA, S.; LIMA, G. P. A. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.113-122, 2000. Disponível em: [http:// coral.ufsm.br/cienciaflorestal/artigos/v10n2/art9v10n2.pdf](http://coral.ufsm.br/cienciaflorestal/artigos/v10n2/art9v10n2.pdf). Acesso em: 10 fev. 2020.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 588 p.
- CLEMENTE, A. C. S. *et al.* Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.
- COELHO, S. V. B. *et al.* Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- COELHO, S. V. B.; FIGUEIREDO, M. A.; CLEMENTE, A. C. S.; COELHO, L. F. S.; ROSA, S. D. V. F. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, jun. 2015.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de café, Safra 2016** - Terceiro levantamento, setembro 2016. CONAB, Brasília, v. 3, n. 3, p. 1-108, set. 2016.
- DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, May./June. 2006.
- DUSSERT, S. *et al.* Oxidative stress, phospholipid and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 4, p. 192-204, Apr. 2006.
- FANTAZZINI, T. B. **Teste de Tetrazólio em Café: Fisiologia e Bioquímica de Enzimas na Estimção da Germinação das Sementes**. 2018. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2018.
- FANTAZZINI, T. B.; ROSA, S. D. V. F.; PEREIRA, C. C.; PEREIRA, D. S.; CIRILLO, M. A.; OSSANI, P. C. Association between the artificial aging test and the natural storage of coffee seeds. **Journal of Seed Science**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 164-172, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista brasileira de biometria**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Disponível em: <http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>. Acesso em: 10 fev. 2020. doi: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

FIGUEIREDO, M. A. **Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L. visando à criopreservação**. 2016. 45 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.

FREITAS, R. A.; DIAS, D. C. F. S.; OLIVEIRA, G. A.; DIAS, L. A. S.; JOSÉ, I. C. Mudanças fisiológicas e bioquímicas em sementes de algodão naturais e envelhecidas artificialmente. **Seed Science and Technology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 253-264, 2006. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/contentone/ista/sst/2006/00000034/00000002/art00001>. Acesso em: 10 fev. 2020.

FREITAS, R. T. *et al.* Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v. 44, n. 2, p. 445-451, Jul. 2016.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

LLOYD, J. D. Borates and their biological applications. **The International Research Group on Wood Preservation**. Doc IRG/WP 98-30178. IRG Secretariat Stockholm, Sweden, 1998. 25 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 35, de 29 de novembro de 2012**. Estabelece as normas para a produção e comercialização de material de propagação de cafeeiro (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) e os seus padrões, com validade em todo o território nacional, visando à garantia de sua identidade e qualidade. 2012. Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_24015030_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_35_DE_29_DE_NOVEMBRO_DE_2012.aspx. Acesso em: 02 fev. 2020.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015. 660 p.

MARTINS, M. Q.; MARÇAL, T. S.; SOUZA, M. F.; COELHO, R. I. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de laranjeira 'Folha Murcha'. **Revista de Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 38, 3, p. 407-413, 2015.

MORAES, C. E.; LOPES, J. C.; FARIAS, C. C. M.; MACIEL, K. S. Qualidade fisiológica de sementes de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* em função do teste de envelhecimento acelerado. **Ciência Florestal**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 213-223, 2016.

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

PEREIRA, C. C. **Cultura de embriões e germinação de sementes de diferentes níveis de qualidade para a produção de mudas de café**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2017.

ROSA, S. D. V. F.; MELO, L. Q.; VEIGA, A. D.; OLIVEIRA, S.; SOUZA, C. A. S.; AGUIAR, V. A. Formação de mudas de *Coffea arabica* L. cv. Rubi utilizando sementes ou frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 349-356, mar./abr. 2007.

SANTANA-BUZZY, N.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; KU-CAUICH, J. R.; MIJANGOS-CORTEZ, J.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L. C.; CANTO, A.; QUIROZ-FIGUEROA, F.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Chesterfield, v. 43, n. 6, p. 507-520, 2007.

SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilho) – Euphorbiaceae. **Revista do Instituto Florestal**, [s.l.], v.19, n.1, p.1-12, 2007. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr81/cap01.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2020.

SILVA, J. B.; LAZARINI, E.; SÁ, M. E. Comportamento de sementes de cultivares de soja, submetidas a diferentes períodos de envelhecimento acelerado. **Bioscience Journal**, [s.l.], v.26, n.5, p.755-762, 2010. Disponível em: <http://www.eer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7187>. Acesso em: 02 fev. 2020.

THOMAZIELLO, R. A.; FAZUOLI, L. C.; PEZZOPANE, J. R. M.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. **Café arábica: cultura e técnicas de produção**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2000. 82 p. (Boletim Técnico, 187).

VALIO, I. F. M. Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea Arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. **Journal of Seed Technology**, East Lansing, v. 5, n. 1, p. 32-39, 1980.

ANEXOS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância do teste de germinação para protusão radicular, germinação, plantulas normais com folhas cotiledonares expandidas, matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz de sementes com diferentes qualidades, recém-colhidas ou envelhecidas.

	Protusão radicular	Germinação	Plantulas com folhas cotiledonares expandidas	Matéria seca da parte aérea	Matéria seca da raiz
Qualidade das sementes	**	**	**	**	**
CV	7,73	16,74	21,3	23,17	25

*Significativo ($p>0,5$); **Altamente significativo ($p>0,1$).

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância da germinação *in vitro* para plantulas normais, anormais, mortas, altura, diâmetro do caule e numero de folhas, de embriões zigóticos de café cultivados *in vitro*, adivindos de sementes com diferentes qualidades, recém-colhidas ou envelhecidas e diferentes tempos de cultivo, 60 e 120 dias.

	Plantulas normais	Plantulas anormais	Plantulas mortas	Altura de plantulas	Diâmetro	Número de folhas de plântuas
Qualidade das sementes	*					
Tempo <i>in vitro</i>		**		*	**	**
Qualidade das sementes X Tempo <i>in vitro</i>						
CV	5,16	44,57	41,96	13,20	9,11	17,37

*Significativo ($p>0,5$); **Altamente significativo ($p>0,1$).

Fonte: Da autora (2020).

CAPITULO 3 ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS DE CAFÉ OBTIDAS DE CULTURA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE SEMENTES ENVELHECIDAS

RESUMO

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo, e o Brasil se destaca como o maior produtor, o que contribui substancialmente para a pauta de exportações brasileiras. Para a implantação das lavouras é necessário a obtenção de mudas de alto padrão de qualidade, a partir de sementes que necessitam ter alto vigor, germinação e uniformidade para, conseqüentemente, haver a formação de uma planta produtiva. Porém, há uma rápida perda de viabilidade das sementes de café. A baixa qualidade das sementes armazenadas ocorre devido à deterioração, e alguns estudos têm demonstrado que em sementes de café, o endosperma pode ter uma maior sensibilidade à deterioração do que os embriões, sendo que, quando excisados, esses embriões cultivados *in vitro* podem germinar e gerar plântulas normais. Contudo, um número substancial de plantas cultivadas *in vitro* não sobrevive à transferência para ambiente de estufa ou de campo. Com isso, o objetivo neste trabalho foi avaliar a aclimatização de plântulas oriundas de embriões zigóticos de café retirados de sementes envelhecidas, em diferentes substratos e ambientes, para a produção de mudas bem desenvolvidas e aptas ao plantio. Para tanto, plântulas foram obtidas a partir do cultivo *in vitro* de embriões retirados de sementes com dois níveis de qualidade, sementes recém-colhidas ou sementes que passaram pelo envelhecimento acelerado. Os embriões zigóticos foram extraídos das sementes e colocados em contato com meio MS e, após 60 e 120 dias, as plantas foram avaliadas por meio da contagem de plântulas normais, anormais e mortas. As plântulas cultivadas *in vitro* por 60 dias, com melhor qualidade, foram transplantadas utilizando-se dois diferentes substratos (Tropstrato e fibra de coco) e levadas para aclimatização em dois ambientes (câmara de crescimento e casa de vegetação com nebulização). Para comparar os resultados, foram avaliados a altura das plantas, o diâmetro do caule, o número de folhas, teor de clorofila e taxas de crescimento. Conclui-se que o ambiente casa de vegetação com nebulização foi melhor para o crescimento das plântulas, possivelmente pela maior radiação e temperatura. O melhor substrato foi a fibra de coco, por garantir melhor desenvolvimento tanto para plântulas oriundas de sementes recém-colhidas, quanto para as de sementes envelhecidas. É possível desenvolver mudas sadias a partir de sementes com menor viabilidade, como as envelhecidas utilizadas nesse estudo.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Cultura *in vitro*. Aclimatização. Câmara de crescimento. Casa de vegetação. Substratos.

ABSTRACT

Coffee is the second most consumed beverage in the world and Brazil is the largest producer, which contributes substantially to the list of Brazilian exports. For the implantation of the crops, it is necessary to obtain seedlings of high quality standard, made from seeds, which need to have high vigor, germination and uniformity to consequently have the formation of a productive stand. However, there is a rapid loss of viability of coffee seeds. The low quality of stored seeds is due to deterioration. Some studies have shown that in coffee seeds, the endosperm may have a greater sensitivity to deterioration than embryos, and when excised these embryos grown *in vitro* can germinate and generate normal seedlings. However, a substantial number of plants grown *in vitro* do not survive transfer to a greenhouse or field environment. Thus, the objective in this work was to evaluate the acclimatization of seedlings from zygotic coffee embryos taken from aged seeds, in different substrates and environments, for the production of well developed seedlings suitable for planting. For this purpose, seedlings were obtained from the *in vitro* cultivation of embryos taken from seeds with two levels of quality, freshly harvested seeds or seeds that have undergone accelerated aging. The zygotic embryos were extracted from the seeds and placed in contact with MS medium and, after 60 and 120 days, the plants were evaluated by counting normal, abnormal and dead seedlings. Seedlings grown *in vitro* for 60 days, with better quality, were transplanted using two different substrates (Tropstrato and coconut fiber) and taken to acclimatization in two environments (growth chamber and greenhouse with fogging). To compare the results, plant height, stem diameter, number of leaves and chlorophyll content were evaluated. Thus, it is concluded that the greenhouse environment with fogging was better for seedling growth, possibly due to higher radiation and temperature. The best substrate was coconut fiber, as it ensures better development for both freshly harvested seedlings and aged seedlings. It is possible to develop healthy seedlings from seeds with less viability, such as the aged ones used in this study.

Keywords: *Coffea arabica* L. *In vitro* culture. Acclimatization. Different environments. Substrates.

1 INTRODUÇÃO

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo, e o Brasil se destaca como o maior produtor. Segundo a CONAB (2020), as exportações de café no país, de janeiro a novembro de 2019, totalizaram US\$ 4.691 milhões, sendo uma das culturas de maior expressão, tanto no mercado interno quanto no externo. Para o ano 2020, estima-se uma área total plantada de aproximadamente 2,16 milhões hectares, um acréscimo de 1,4% em relação ao ano anterior (CONAB, 2020).

Para a implantação das lavouras é necessário a obtenção de mudas de alto padrão de qualidade para garantir a sua sobrevivência quando levadas ao campo. Essas mudas são feitas a partir de sementes, que necessitam ter alto vigor, germinação e uniformidade para, conseqüentemente, haver a formação de um estande produtivo e de qualidade (ROSA, 2007).

Porém, existe uma preocupação com a rápida perda de viabilidade das sementes de café (*Coffea arabica* L.). A baixa qualidade das sementes armazenadas ocorre devido à deterioração, que é um processo natural, entretanto, pode ser potencializado na pós-colheita. O processamento, a secagem e o armazenamento são exemplos de atividades que podem acelerar a degradação das sementes devido a formação de espécies reativas de oxigênio, que causam danos nos tecidos vegetais (SANTOS, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que, em sementes de café, o endosperma pode ter uma maior sensibilidade à deterioração que os embriões, sendo que, quando excisados esses embriões podem germinar e gerar plântulas normais (PEREIRA, 2017; FIGUEIREDO, 2016; COELHO *et al.*, 2015; DUSSERT *et al.*, 2006).

Os eixos embrionários constituem um bom explante para o cultivo *in vitro*, pois, possuem uma germinação mais uniforme e rápida em relação às sementes. A cultura *in vitro* de embriões zigóticos, também permite estudos detalhados sobre nutrição e fisiologia do embrião. No caso de culturas como o cafeeiro, pode ser usada com o objetivo de adequá-las à melhor época de plantio (HU; FERREIRA, 1998), como estações chuvosas, e cultivo de embriões de sementes armazenadas que apresentam baixa viabilidade.

Contudo, um número substancial de plantas cultivadas *in vitro* não sobrevive à transferência para ambiente de estufa ou de campo. As plântulas são desenvolvidas em tubos de ensaio sob baixo nível de luz, condições assépticas, em um meio contendo açúcares e nutrientes para permitir o crescimento heterotrófico e em uma atmosfera com alto nível de umidade (PAIVA; PAIVA, 2001). Essas condições dificultam a adaptação das plântulas às novas condições ambientais.

Para auxiliar na adaptação das plântulas durante a aclimatização, as condições climáticas precisam ser alteradas progressivamente, de forma a diminuir o estresse, evitando a ocorrência de danos e, conseqüentemente, senescência das plântulas. Condições como umidade relativa, temperatura, intensidade de luz, além de um substrato que auxilie no processo autotrófico são importantes características a serem estabelecidas para a adaptação (HAZARIKA, 2006).

Vários estudos são realizados sobre aclimatização de plântulas de café *in vitro* (ALMEIDA, 2010; CARVALHO *et al.*, 1999; FAHL *et al.*, 1994; MACIEL *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2007; SANTOS, 2014) e de estabelecimento de mudas (ASSIS *et al.*, 2011; BRAUM, 2007; DANDENGO, 2013; MELO, 1999), porém, trabalhos relacionados com a aclimatização de plântulas advindas de embriões zigóticos de café cultivados *in vitro* são escassos.

Com isso, o objetivo neste trabalho foi avaliar a aclimatização de plântulas oriundas de embriões zigóticos de café retirados de sementes envelhecidas ou recém colhidas em diferentes substratos e ambientes, para a produção de mudas bem desenvolvidas e aptas ao plantio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e material vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura, e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes da safra 2017, da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62.

2.2 Colheita, seleção e processamento das sementes

Os frutos de café foram colhidos na Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha, localizada a aproximadamente 110 Km de Lavras. Os frutos no estágio de maturação cereja foram seletivamente colhidos nos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Após a colheita dos frutos, esses foram lavados para a separação de frutos chochos, malformados e brocados, além de impurezas, antes de serem despolpados mecanicamente. As sementes foram desmuciladas por fermentação em água, em temperatura de 30 °C, por 24 horas e, em seguida, foram lavadas em água corrente e submetidas à secagem à sombra, em peneiras, para a retirada da umidade superficial. Após a pré-secagem, as sementes foram secadas em secador estacionário a 25 °C por cerca de 10h por dia. A temperatura da massa de sementes foi monitorada com termômetro de mercúrio e as sementes reviradas a cada 1h até atingirem um teor de água de 12%.

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes.

As sementes foram armazenadas em câmara fria com temperatura de 10 °C e com UR de 55%, em sacos plásticos até a realização dos testes, quando foram homogeneizadas e tiveram os pergaminhos retirados manualmente.

2.3 Obtenção dos lotes de sementes

Foram utilizados dois lotes de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, sendo um de melhor qualidade, constituído de sementes recém-colhidas, e o outro, de mais baixa qualidade, obtidos pelo envelhecimento acelerado das sementes.

A técnica do envelhecimento acelerado consiste em colocar as sementes em uma camada única e uniforme sobre telado, no interior de caixas plásticas, do tipo gerbox contendo 40 mL de água e manter em temperatura de 42 °C, em BOD, por seis dias. As sementes recém-colhidas também foram colocadas sobre telados de caixas do tipo gerbox contendo 40 mL de água destilada, em BOD a uma temperatura de 25 °C, por seis dias para umedecimento e padronização da umidade dos níveis de qualidade.

2.4 Assepsia das sementes

Antes da extração dos embriões, as sementes passaram por um processo de assepsia, sendo embebidas em formaldeído por 20 minutos em agitação, lavadas três vezes com água destilada e autoclavada e colocadas para embeber por 72 horas em ácido bórico. Antes da extração dos embriões as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

2.5 Extração e cultura *in vitro* dos embriões

Após a assepsia das sementes, os embriões foram extraídos em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e foram inoculados em meio de cultura Murashige e Skoog, mais conhecido como sais (micro e macro nutrientes MS (MURASSHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121 °C durante 20 minutos. Foram inoculados oito blocos de 40 embriões em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura, os quais foram mantidas em BOD com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C, durante 120 dias.

Aos 60 dias e aos 120 dias, as plântulas foram avaliadas por meio da porcentagem de plântulas normais, anormais, mortas, altura de plântulas, diâmetro do caule e número de folhas. Os resultados das avaliações de plântulas cultivadas por 120 dias apresentaram maior número de anormalidades e, assim, apenas as de 60 dias de cultivo foram utilizadas para os estudos de aclimatização.

2.6 Aclimatização das mudas

As plântulas iniciaram o processo de aclimatização após 60 dias de desenvolvimento em meio de cultura, quando foram transferidas para saquinhos plásticos contendo dois diferentes substratos, Tropstrato café ou Fibra de coco, sendo utilizados 20 saquinhos por

tratamento, divididos em quatro blocos de cinco saquinhos de cada tratamento. Foram adicionados aos saquinhos com as mudas 5 g do adubo de liberação lenta Osmocote® a cada dois meses.

Para manter as plântulas úmidas nos primeiros dias do transplântio, os saquinhos com as plântulas foram envolvidos com sacos plásticos transparentes, que foram cortados uma das duas pontas a cada sete dias, até que ficassem totalmente abertos com três semanas. Após esse período, o restante dos sacos plásticos foi removido, e as plântulas permaneceram desta forma até o final do experimento.

As plântulas oriundas de embriões zigóticos de café excisados de sementes envelhecidas ou não, transplantadas para dois tipos diferentes de substratos, foram então alocadas em dois diferentes ambientes:

- a) Em câmara de crescimento vegetal com 12 horas de luz, a 25 °C.
- b) Em casa de vegetação com aproximadamente 90% de umidade relativa do ar com sistema de nebulização automático, temperatura média próxima de 30 °C, e coberta com sombrite de 75% de luminosidade natural.

2.7 Avaliações das mudas de café

Após cinco meses de crescimento foram realizadas as avaliações dos índices descritos abaixo.

a) Matéria seca

Para avaliação da matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raízes (MSR) e matéria seca total (MST), foi feita a separação da parte aérea e de raiz com auxílio de bisturi e embaladas em sacos de papel com identificação, depois, foram colocadas em estufa a 70 °C por um período de aproximadamente 72 horas (até adquirirem peso constante). A determinação do peso da matéria seca foi feita em balança digital de precisão. Com os dados dessas avaliações foi possível obter o índice morfológico Razão parte aérea/raiz (MSPA/MSR).

b) Altura, diâmetro do caule, número de folhas e área foliar

Foram realizadas avaliações de diâmetro do caule (mm) e altura (cm) e número de folhas a cada 30 dias após o transplântio. O diâmetro no colo na altura do solo foi medido com paquímetro (precisão de 0,05 cm) e a altura com régua graduada, tomando-se como padrão a gema terminal (meristema apical). Para a contagem do número de folhas, foram contabilizadas somente as folhas completamente expandidas.

Após cinco meses do transplântio foi analisado a área foliar, obtido pela fórmula:

$$AF = 0,667 \times C \times L \quad (1)$$

Onde C é o comprimento da folha, L é a largura da folha e 0,667 o fator de correção.

c) Índice de clorofila

Os índices de clorofila A, B e Total foram obtidos por meio do aparelho digital ClorofiLOG® modelo CFL 1030 (Falker). As medições foram realizadas das nove as onze horas da manhã, em folhas completamente expandidas, localizadas no terceiro par de folhas a partir do ápice do ramo. Com esses dados, foi calculada também a razão clorofila A e B.

Clorofilog® - É um aparelho portátil que mede de modo não destrutivo e instantâneo, a transmitância de luz através da folha, no comprimento de onda com pico em 650 nm, região de alta absorvância pelas moléculas de clorofila, e com pico em 940 nm, na qual a absorvância pela folha é baixa, servindo como um fator de correção para o teor de água ou espessura da folha (FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA, 2008).

2.8 Análise de crescimento das plântulas de café

A cada trinta dias após o transplântio da fase *in vitro*, foram feitas as avaliações de crescimento, como altura, diâmetro do caule e número de folhas, por cinco meses nas mudas alocadas no ambiente casa de vegetação. Com os dados de crescimento foi possível obter:

a) Taxa de crescimento absoluto caulinar (cm/dia),

$$TCAC = (H2 - H1) / (T2 - T1)$$

Onde H é a altura da planta e T é o tempo em dias.

b) Taxa de crescimento absoluto de espessura caulinar (mm/dia),

$$TCAD = (D2 - D1) / (T2 - T1)$$

Onde H é a altura da planta, T é o tempo em dias e D é o diâmetro caulinar.

c) Taxa de crescimento absoluto em fitomassa fresca (cm³/dia),

$$TCAFFA = (H2 \times D2^2) - (H1 \times D1^2) / (T2 - T1)$$

Onde H é a altura da planta, T é o tempo em dias e D é o diâmetro caulinar.

2.9 Índice de velocidade de crescimento em altura

Foi determinado utilizando-se da fórmula de Edmond e Drapala (1958).

$$I = \frac{(N_1 G_1) + (N_2 G_2) + \dots + (N_n G_n)}{(G_1 + G_2 + \dots + G_n)} \quad (2)$$

Onde:

N_1 = número de dias da primeira medição;

G_1 = altura das plântulas na primeira medição;

N_2 = número de dias da segunda medição;

G_2 = altura das plântulas emergidas na segunda medição;

N_n = número de dias da última medição.

G_n = número de plântulas emergidas na última contagem.

2.10 Delineamento experimental e análises estatísticas

A cultura de embriões foi realizada em delineamento inteiramente casualizado (DIC), divididos em oito repetições de 40 embriões cada, em esquema fatorial 2 x 2, níveis de qualidade de sementes (recém colhidas e envelhecidas) e 2 tempos de avaliação (aos 60 e aos 120 dias da inoculação dos embriões em meio de cultura). Para as avaliações de altura e diâmetro do caule de plântulas e número de folhas, foram utilizadas 8 repetições de 20 plântulas.

O processo de aclimatização das plântulas oriundas de embriões zigóticos foi realizado no delineamento em blocos casualizados (DBC), com quatro blocos de cinco plântulas, em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo 2 níveis de qualidade das sementes (recém-colhida e envelhecida), 2 tipos de substrato (tropstrato e fibra de coco) e 2 ambientes (câmara de crescimento e casa de vegetação).

As análises de crescimento foram feitas somente nas mudas da casa de vegetação, foi montado em DBC com quatro blocos de cinco plântulas, em esquema fatorial 2 x 2 x 6, sendo 2 níveis de qualidade das sementes (recém-colhida e envelhecida), 2 tipos de substrato (tropstrato e fibra de coco) e 6 tempos de avaliação (0; 30; 60; 90; 120; 150 dias após o transplântio).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o *software* estatístico SISVAR (FERREIRA, 2019) e as médias avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro*

Para o estudo da aclimatização de mudas de café oriundas de embriões zigóticos, plântulas foram cultivadas *in vitro*, por períodos de 60 e 120 dias. De acordo com a análise de variância (ANEXO) da germinação *in vitro* dos embriões zigóticos retirados das sementes de café, não houve interação entre os fatores qualidade das sementes (recém-colhida e envelhecida), e o tempo das avaliações (60 e 120 dias da inoculação dos embriões em meio de cultura) para as variáveis plântulas normais, anormais e mortas. Houve efeito significativo do fator isolado qualidade de semente, quanto a normalidade das plântulas germinadas *in vitro* de sementes envelhecias e recém colhidas (TABELA 1).

Tabela 1 - Porcentagem de plântulas normais, anormais e mortas de embriões zigóticos de café cultivados *in vitro* provenientes de sementes recém colhidas e envelhecidas.

Qualidade das sementes	Normais	Anormais	Mortas
Recém colhida	92 a	6 a	1 a
Envelhecida	86 b	7 a	3 a
CV	5,65	41,40	13,76

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

As plântulas das sementes envelhecidas obtiveram uma menor porcentagem de plântulas normais que aquelas vindas de sementes recém-colhidas. Porém, com uma média de 86% de germinação, ainda é um resultado muito significativo que alcança a porcentagem mínima estabelecida para germinação em um lote de sementes de café. Já para as porcentagens de plântulas anormais e mortas, não houve diferenças quanto a qualidade das sementes.

Relacionado às avaliações aos 60 e 120 dias, não houve diferenças estatísticas para a porcentagem de plântulas normais e mortas. Mas o número de plantas anormais aumentou com o tempo, indicando a possibilidade de que, quanto maior o tempo *in vitro*, maior a possibilidade de ocorrerem anomalias nas plântulas de café (TABELA 2).

Tabela 2 - Porcentagem de plântulas normais, anormais e mortas de embriões zigóticos de café cultivados *in vitro* provenientes de sementes recém-colhidas e envelhecidas avaliadas aos 60 e 120 dias da inoculação.

Tempo (dias)	Normais	Anormais	Mortas
60	90 a	4 a	1 a
120	88 a	9 b	3 a
CV	5,65	41,40	13,76

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Conforme os resultados apresentados das plântulas cultivadas *in vitro*, aquelas com 120 dias de desenvolvimento apresentaram maior número de anormalidades e, assim, apenas as de 60 dias de cultivo foram utilizadas para os estudos de aclimatização das mudas.

3.2 Resultados da aclimatização das mudas café

De acordo com os resultados da análise de variância (ANEXO), houve interação tripla entre os fatores ambientes, qualidade de semente, e tipos de substrato para as variáveis matéria seca da parte aérea, de raiz e razão parte aérea/raiz. Para as variáveis diâmetro do caule, número de folhas e área foliar, houve efeito significativo do fator ambiente, enquanto que para a variável altura de plantas, houve efeito isolado dos fatores ambiente e qualidade das sementes.

O ambiente casa de vegetação, no geral, proporcionou maior acúmulo de matéria seca tanto para a parte aérea quanto para a raiz em mudas advindas de sementes recém-colhidas e envelhecidas (TABELAS 3 e 4).

Tabela 3 - Matéria seca da parte aérea (mg) de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois ambientes e dois substratos.

Desdobramento de ambientes e níveis de qualidade			
Ambiente	Substrato	Qualidade das sementes	
		Recém-colhida	Envelhecida
Casa de vegetação	Tropstrato	290 Ab	360 Aa
	Fibra de coco	410 Aa	205 Bb
Câmara de crescimento	Tropstrato	210 Aa	130 Ab
	Fibra de coco	135 Ba	355 Aa

Desdobramento de substratos			
Qualidade das sementes	Substrato	Ambiente	
		Casa de vegetação	Câmara de crescimento
Recém-colhida	Tropstrato	290 A	210 A
	Fibra de coco	410 A	135 B
Envelhecida	Tropstrato	360 A	130 B
	Fibra de coco	205 B	355 A
CV		28,92	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 4 - Matéria seca da raiz (mg) de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois ambientes e dois substratos.

Desdobramento de ambientes e níveis de qualidade			
Ambiente	Substrato	Qualidade das sementes	
		Recém-colhida	Envelhecida
Casa de vegetação	Tropstrato	415 Bb	650 Aa
	Fibra de coco	735 Aa	245 Bb
Câmara de crescimento	Tropstrato	210 Aa	165 Aa
	Fibra de coco	255 Aa	145 Aa

Desdobramento de substratos			
Qualidade das sementes	Substrato	Ambiente	
		Casa de vegetação	Câmara de crescimento
Recém-colhida	Tropstrato	415 A	210 B
	Fibra de coco	735 A	255 B
Envelhecida	Tropstrato	650 A	165 B
	Fibra de coco	245 A	145 A
CV		32,75	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Com o uso do substrato fibra de coco foi possível obter maiores médias de matéria seca de parte aérea nos dois ambientes, para os dois níveis de qualidades das sementes (TABELA

3). Contudo, as mudas de sementes recém-colhidas produzidas em ambiente de câmara de crescimento, não apresentaram diferenças entre os substratos.

As mudas advindas de sementes recém-colhidas não apresentaram diferença na matéria seca da parte aérea, nos diferentes ambientes e substrato tropstrato (TABELA 3), assim como em câmara de crescimento nos substratos (TABELA 3). Isso mostra maior capacidade de adaptação das mudas de sementes recém-colhidas, quanto aos ambientes e substratos que as mudas oriundas de sementes envelhecidas, as quais apresentaram diferenças nos ambientes, com melhor desenvolvimento em casa de vegetação e em fibra de coco (TABELA 3).

Para a matéria seca de raízes (TABELA 4) em casa de vegetação, as mudas advindas dos embriões zigóticos de sementes recém-colhidas obtiveram maior acúmulo em substrato fibra de coco, enquanto que mudas de embriões de sementes envelhecidas obtiveram maior acúmulo em substrato tropstrato.

Marcuzzo *et al.* (2005), analisando o desenvolvimento de mudas de café em diferentes substratos e doses de fertilizantes de liberação gradual, observaram que a matéria seca da parte aérea obteve um crescimento linear de acordo com a dosagem do fertilizante, chegando a uma média de 1,13 g no substrato Plantmax® e de 0,92g no substrato Bioplant®. A matéria seca de raiz obteve o mesmo padrão de crescimento com média de 0,50 g no substrato Plantmax® e de 0,42 g no substrato Bioplant®.

Rosa *et al.* (2007), em seu experimento sobre a formação de mudas de *C. arabica* L. CV. Rubi, utilizando sementes ou frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, observaram que após 180 dias do início do experimento, a média da matéria seca da parte aérea em 9 tratamentos, sementes sem pergaminho obtiveram o maior valor de 11,57 g e os piores foram em frutos verdes 10 dias após a colheita de 6,56 g. A média da matéria seca do sistema radicular nas sementes sem pergaminho obtiveram o maior valor médio 2,96 g, e o pior foi em fruto verde 10 dias após a colheita com média de 1,38 g.

Maximiano *et al.* (2011), estudando diferentes concentrações de biofertilizantes foliares de esterco bovino em mudas de cafeeiro, obtiveram, após 5 meses, uma média da matéria seca da parte aérea de 1,05 g e uma média da matéria seca da raiz de 0,40 g. A aplicação foliar de biofertilizante, nas concentrações estudadas, não proporcionou alteração no desenvolvimento de mudas de cafeeiro.

Marana *et al.* (2008) avaliando o crescimento de mudas de café produzidas em tubetes, aos 150 dias após a semeadura, cultivadas com adubo de liberação lenta nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 kg m⁻³, obtiveram uma maior média da matéria seca caule no substrato Vermicomposto com 0,17 g nas 3 últimas doses e, no substrato Plantmax-café® com média

0,24 g nas 3 últimas doses. A média de matéria seca de folhas no substrato Vermicomposto foi de 1,01 g e no substrato Plantmax-café® foi de 1,33 g ambos na dose 20. A maior média da matéria seca de raiz foi em substrato Vermicomposto com 0,23 g na dose 05 e no substrato Plantmax® com 0,33 g na dose 10.

Carvalho *et al.* (1999) estudando o efeito do tratamento de sementes na emergência e desenvolvimento de mudas de cafeeiro *C. arabica* L., observaram após 180 dias da semeadura, com retirada manual e mecânica do pergaminho, a média do peso da matéria seca da parte aérea foi de 2,0541g e 2,1200g respectivamente, e a média do peso da matéria seca de raiz foi de 0,5258 g e 0,4800 g, sendo assim, a retirada manual foi melhor que a mecânica.

Tristão (2005) verificou em seu trabalho sobre produção de mudas micorrizadas de cafeeiro em diferentes substratos orgânicos, que plantas que desenvolveram em substratos Viva Verde apresentaram maior produção de matéria seca da parte aérea, com média de 6,1g, já o pior tratamento obteve média de 0,3 g em substrato Golden Mix 80, ambas inoculados com *G intraradices*.

Como observado no presente estudo, obteve-se menores médias que as pesquisas citadas. Porém, as medidas das mudas do presente estudo foram feitas aos 150 dias, trinta dias a menos que os estudos citados. O melhor tratamento para a matéria seca da parte aérea foi de 0,41 g, e a matéria seca da raiz foi 0,735 g em sementes recém-colhidas, no substrato fibra de coco, em casa de vegetação. O pior tratamento atingiu 0,13 g em sementes envelhecidas, no substrato tropstrato em câmara de crescimento. Já a matéria seca da raiz, alcançou a menor média com 0,145 g, em sementes envelhecidas, no substrato fibra de coco, na câmara de crescimento.

De acordo com os resultados das médias da razão raiz/parte aérea, constata-se que maiores valores foram obtidos nas mudas oriundas de embriões de sementes envelhecidas, no substrato fibra de coco e em câmara de crescimento (TABELA 5). Esse tratamento apresentou maiores médias de matéria seca de parte aérea do que matéria seca de raízes. As mudas de embriões de sementes recém-colhidas, obtiveram maiores médias de matéria seca de parte aérea do que as de sementes envelhecidas, mas apresentaram também maiores médias de matéria seca de raízes.

Tabela 5 - Razão parte aérea / raiz de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois ambientes e dois substratos.

Desdobramento de ambientes e níveis de qualidade			
Ambiente	Substrato	Qualidade das sementes	
		Recém-colhida	Envelhecida
Casa de vegetação	Tropstrato	0,70 Aa	0,57 Aa
	Fibra de coco	0,58 Aa	0,92 Aa
Câmara de crescimento	Tropstrato	1,00 Aa	0,81 Ab
	Fibra de coco	0,53 Ba	2,76 Aa

Desdobramento de substratos			
Qualidade das sementes	Substrato	Ambiente	
		Casa de vegetação	Câmara de crescimento
Recém-colhida	Tropstrato	0,70 A	1,00 A
	Fibra de coco	0,58 A	0,53 A
Envelhecida	Tropstrato	0,57 A	0,81 A
	Fibra de coco	0,92 B	2,76 A
CV		58,84	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Para a variável altura de planta, foi observado que as mudas advindas de embriões de sementes recém-colhidas, aclimatizadas em câmara de crescimento a 25 °C (TABELA 6), apresentaram maiores médias para essa variável. O tipo de substrato não influenciou na altura de plantas (TABELA 6).

Tabela 6 - Altura de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois ambientes.

Qualidade de sementes	Altura (cm)
Recém-colhida	3,74 a
Envelhecida	2,99 b
Ambiente	
Casa de vegetação	3,07 b
Câmara de crescimento	3,65 a
CV	
	17,49

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Segundo Thomaziello *et al.* (2000), para uma muda que se desenvolveu normalmente, quando apresentar quantidade de folhas ideal para o plantio, que são de 5 ou 6 pares, estará com altura aproximada de 15 cm. Porém, no presente estudo, as médias de todos os tratamentos foram expressivamente menores.

Assim como a altura, diâmetro do caule das mudas também foi maior quanto cultivadas em câmara de crescimento (TABELA 7). De acordo com Poorter *et al.* (2011) e Poorter e Nagel (2000), plantas que crescem em condições de baixa radiação geralmente fixam menores quantidades de carbono, transpiram menos e, portanto, apresentam uma maior alocação de biomassa para o caule. Este fato também foi ser evidenciado por Soares (2012) e Vieira (2013) em espécies arbóreas tropicais.

Tabela 7 - Diâmetro do caule, número de folhas e área foliar de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, aclimatizadas em dois ambientes.

Ambiente	Diâmetro (mm)	Número de folhas	Área foliar
Casa de vegetação	1,66 b	7 a	8,33 a
Câmara de crescimento	2,00 a	6 b	4,02 b
CV	21,02	15,63	31,40

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Em ambientes com menor radiação, como o que ocorre na câmara de crescimento, as plântulas tendem a apresentar uma maior altura, como efeito do estiolamento de plantas, uma vez que esta cresce em busca da luminosidade (TAIZ; ZEIGER, 2017). Esse fato também foi observado no presente trabalho, em que houve um aumento em altura e do diâmetro do caule das mudas em condições com menor radiação.

Marana *et al.* (2008) avaliando o crescimento de mudas de café produzidas em tubetes, aos 150 dias após a semeadura, nas doses de adubo de liberação lenta 0, 5, 10, 15 e 20 kg m⁻³, obtiveram um valor mínimo, médio e máximo do diâmetro do caule em mm de 2,02, 3,08 e 3,32 respectivamente.

Maximiano *et al.* (2011) estudando a aplicação foliar de biofertilizante, em diferentes doses, em mudas de cafeeiro, no final do ciclo de produção das mudas, obteve, após 5 meses, uma média do diâmetro do caule de 1,67 mm. A aplicação foliar de biofertilizante de esterco bovino, nas concentrações estudadas, não proporcionou alteração no desenvolvimento de mudas de cafeeiro.

Rosa *et al.* (2007) em seu experimento sobre a formação de mudas de *Coffea arabica* L. CV. Rubi, utilizando sementes ou frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, observaram após 180 dias do início do experimento, a média do diâmetro do caule que sementes sem pergaminho obtiveram o maior valor de 3,11mm e o pior foi em fruto verde 10 dias após a colheita com média de 2,69 mm.

Silva *et al.* (2009) avaliaram o desenvolvimento de mudas de cafeeiro sob doses de materiais orgânicos misturados ao substrato esterco bovino, cama de aviário e húmus de mata e obtiveram respectivamente diâmetro do caule mínimo, médio e máximo avaliadas após 160 dias depois da sementeira de 1,92 mm, 2,65 mm e 3,54 mm.

Com relação às variáveis número de folhas e área foliar, foram observados maiores valores nas mudas produzidas em ambiente de casa de vegetação (TABELA 7). De acordo com Taiz e Zeiger (2017), o desenvolvimento de plantas em ambientes de maior radiação, como em casa de vegetação, a taxa de crescimento do caule diminui, as folhas expandem e os cloroplastos se desenvolvem a partir de etioplastos, e as folhas se tornam verdes com o acúmulo da clorofila.

Outro fator que pode ter favorecido o maior crescimento em casa de vegetação é a maior temperatura, que foi em média de 30 °C, enquanto que em câmara de crescimento foi de 25 °C. A temperatura afeta todas as reações bioquímicas da fotossíntese, bem como a integridade de membranas em cloroplastos, não surpreendendo que as respostas à temperatura sejam complexas. As taxas de respiração aumentam em função da temperatura (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Em temperaturas baixas, a fotossíntese C3 pode também ser limitada por fatores como a disponibilidade de fosfatos no cloroplasto. As sínteses de amido e sacarose diminuem rapidamente com o decréscimo da temperatura, reduzindo a demanda por trioses fosfato e causando a limitação de fosfatos (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Segundo Resende *et al.* (2008), o número de folhas por explante é uma das variáveis mais importantes a ser considerada durante a aclimatização, uma vez que fornece uma área foliar satisfatória para a fotossíntese do sistema.

De acordo com Rosa *et al.* (2007), mudas de café com meio ano, gastam, em média, seis meses para serem formadas e podem ser levadas para o campo quando apresentarem de três a quatro pares de folhas verdadeiras. Observou-se neste trabalho, que na época em que as mudas foram avaliadas, ou seja, aos 150 dias do transplante, todos os tratamentos apresentaram média superior a seis pares de folhas. Os tratamentos que se destacaram, apresentaram uma média de até oito pares de folhas.

O crescimento e os padrões de distribuição da biomassa nas plantas são regulados por meio do investimento em órgãos, buscando minimizar efeitos de um fator limitante, sendo altamente responsáveis por diferenças interespecíficas (KITAJIMA, 1994; POOTER *et al.*, 2011). O fator limitante no menor desempenho das mudas em câmara de crescimento comparado às aclimatizadas em casa de vegetação pode ser explicado pela menor intensidade luminosa disponível no ambiente, mesmo com sombrite de 75% na casa de vegetação.

Indivíduos expostos à elevada intensidade luminosa tendem a apresentar maior capacidade fotossintética e, conseqüentemente, maior acumulo de massa. Bjorkman (1981) e Oguchi *et al.* (2003) sugerem que a alta capacidade fotossintética sob maior irradiância estaria relacionada ao aumento na concentração da rubisco nos cloroplastos.

Em geral, plântulas *in vitro* requerem baixa luminosidade relativa e quando submetidas ao aumento de luz, sofrem um processo de destruição das moléculas de clorofila, tornando-se cloróticas e queimadas. Isso ocorre pelo pequeno desenvolvimento das plantas *in vitro* e a baixa atividade fotossintética (PAIVA; PAIVA, 2001). Por isso, a utilização de câmaras de crescimento para a aclimatização é amplamente difundida. Porém, de acordo com os resultados deste estudo, os embriões zigóticos de café cultivados *in vitro* não apresentaram grande sensibilidade a uma maior intensidade luminosa, como no caso da casa de vegetação, durante a aclimatização.

Além disso, mudas de café advindas de sementes, são geralmente produzidas em viveiros na presença de sombrite, devido à grande sensibilidade a radiação solar direta (ASSIS *et al.*, 2019; BRAUN *et al.*, 2007; DARDENGO *et al.*, 2013). Essa característica da planta de café pode ser explicada devido a sua origem em ambientes sombreados nas florestas da África (FAHL *et al.*, 1994). O cafeeiro pode ser conduzido em ambientes de baixa luminosidade, pois apresenta uma baixa irradiância de saturação, variando de 300 a 600 $\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (KUMAR; TIESZEN, 1980; FAHL *et al.*, 1994). Isso faz com que possa ser cultivado em sistemas mais sombreados, onde há predominância de baixa radiação. Porém, é necessária uma quantidade mínima de radiação para o funcionamento do aparato fotossintético de forma eficiente. Entretanto, no caso da câmara de crescimento, com irradiância média de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi limitante ao crescimento das mudas, mesmo sendo potencialmente mais sensíveis a radiações mais altas.

As mudas de café produzidas por meio da cultura de tecidos também precisam de sombreamento quando em um ambiente natural, uma vez que são mais frágeis quando comparadas às mudas produzidas por sementes. Santos *et al.* (2014) ao estudarem o processo de aclimatização de mudas de *C. canephora* oriundas do cultivo *in vitro* constataram uma maior sobrevivência de plantas sob nível de sombreamento de 50% quando comparado com o de 30%.

Carvalho *et al.* (2011) observaram que plântulas de cafeeiro arábica cv. Catuaí Vermelho provenientes de embriogênese somática indireta apresentaram desenvolvimento mais rápido que plantas obtidas por meio da germinação de sementes, apresentando diâmetro de copa superior após 30 meses de plantio no campo, demonstrando que o desempenho agrônômico das plantas obtidas através da embriogênese somática direta é semelhante ao daquelas obtidas pela

germinação de sementes. No presente trabalho, com a cultura de embriões zigóticos, mesmo os de sementes envelhecidas, até o presente momento, parece ter bom desempenho de crescimento.

3.3 Análise de clorofilas

De acordo com os resultados da análise de variância (ANEXO) dos índices de clorofila A, encontrados nos diferentes tratamentos, houve interação tripla entre os fatores ambientes (casa de vegetação ou câmara de crescimento), qualidade das sementes (recém-colhida ou envelhecida) e substrato (fibra de coco ou Tropstrato). Para os índices de clorofila total, não houve interação entre os fatores, entretanto, houve significância de todos os fatores isolados. Para a razão clorofila A e B houve interação dupla entre os níveis de qualidade e substratos. Já, a análise de variância (ANEXO) para a clorofila B mostrou significância estatística para os fatores ambientes e substratos isoladamente.

Os índices de clorofila A diferiram pouco entre os tratamentos, contudo, de forma geral, as menores médias foram encontradas nas mudas advindas de embriões de sementes envelhecidas, no substrato fibra de coco (TABELA 8).

Tabela 8 - Índices de clorofila A de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois ambientes e dois substratos.

Desdobramento de ambientes e níveis de qualidade			
Ambiente	Substrato	Qualidade das sementes	
		Recém-colhida	Envelhecida
Casa de vegetação	Tropstrato	184,20 Aa	191,61 Aa
	Fibra de coco	177,82 Aa	151,87 Ab
Câmara de crescimento	Tropstrato	186,60 Aa	143,81 Ba
	Fibra de coco	158,62 Aa	155,06 Aa
Desdobramento de substratos			
Qualidade das sementes	Substrato	Ambiente	
		Casa de vegetação	Câmara de crescimento
Recém-colhida	Tropstrato	184,20 A	186,60 A
	Fibra de coco	177,82 A	158,62 A
Envelhecida	Tropstrato	191,61 A	143,81 B
	Fibra de coco	151,87 A	155,06 A
CV			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Com relação aos índices de clorofila total nas mudas de café, observou-se melhores resultados para aquelas oriundas de embriões de sementes recém-colhidas, cultivadas em casa de vegetação e em Tropstrato (TABELA 9).

Tabela 9 - Índices de clorofila total de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois ambientes e dois substratos.

Qualidades das sementes	Teor de clorofila total
Recém-colhidas	251,43 a
Envelhecidas	228,54 b
Ambientes	
Casa de vegetação	254,36 a
Câmara de crescimento	225,61 b
Substratos	
Tropstrato	252,65 a
Fibra de coco	227,31 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

Plantas adaptadas à baixa radiação, como as cultivadas *in vitro*, quando submetidas a um aumento brusco da radiação solar, podem não ter a capacidade de sobreviverem a essa nova condição devido à sua suscetibilidade à fotoinibição (POWELS, 1984; KITAO *et al.*, 2000). A adaptação das plantas ao novo ambiente depende do ajuste de seu sistema fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível. As respostas destas adaptações serão refletidas no crescimento global da planta (ENGEL; POGGIANI, 1991).

A aclimatização a diferentes radiações tem conseqüentes alterações que ocorrem com o intuito de maximizar os processos metabólicos e garantir o crescimento e desenvolvimento do indivíduo. Tais alterações envolvem ajustes dos órgãos e organelas fotossintetizantes como a composição de pigmentos fotossintéticos (SILVESTRINE *et al.*, 2007; LAGE-PINTO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012) e, conseqüentemente, a capacidade fotossintética (SILVESTRINE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008; PORTES *et al.*, 2010). Portanto, a maior quantidade de clorofila A e clorofila total encontradas nas mudas advindas do cultivo de embriões de sementes recém-colhidas, dá indícios de maior capacidade de adaptação destas em se adaptarem ao ambiente novo, com maior radiação.

Avaliando-se os índices de clorofila B nos diferentes locais, o ambiente de câmara de crescimento favoreceu maiores médias que o ambiente de casa de vegetação, no substrato Tropstrato (TABELA 10). A clorofila B tem como função a ampliação da faixa de luz utilizada

pela fotossíntese, sendo considerado um pigmento acessório. Ao absorver a luz, a clorofila B transfere a energia para uma molécula de clorofila A, que vai utilizá-la para a realização da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Tabela 10 - Índices de clorofila B de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, aclimatizadas em dois ambientes e dois substratos.

Ambientes	Clorofila B	Substratos	Clorofila B
Casa de vegetação	64,58 b	Fibra de coco	66,47 b
Câmara de crescimento	77,80 a	Tropstrato	76,09 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

A maior quantidade de clorofila B nas folhas das mudas cultivadas na câmara de crescimento, que possui menor radiação, pode favorecer a absorção de fótons, uma vez que este pigmento absorve energia em comprimentos de onda diferentes em relação à clorofila A (GONÇALVES *et al.*, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2017). Isto é refletido em uma menor razão clorofila A e B, comumente encontrada na sombra (KITAJIMA; HOGAN, 2003; BAOLI *et al.*, 2005; LAMBERS *et al.*, 2008).

As folhas das mudas apresentaram respostas comumente encontradas para plantas aclimatadas em diferentes ambientes luminosos. O aumento da concentração de clorofila em câmara de crescimento, que apresenta menor radiação que em casa de vegetação, é uma resposta amplamente relatada para plantas submetidas a essa condição (REYES *et al.*, 1996; GONÇALVES *et al.*, 2001; LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001; KITAJIMA; HOGAN, 2003; REGO; POSSAMAI, 2006; MARTINAZZO *et al.*, 2007). A clorofila é constantemente sintetizada e destruída na presença de luz, e a velocidade de decomposição pode ser maior em condições de alta radiação solar (KRAMER; KOZLOWSKI, 1979).

Simultaneamente, as mudas cultivadas com substrato Tropstrato alcançaram maiores valores de clorofila B que o substrato fibra de coco (TABELA 10). O substrato Tropstrato possui macro e micronutrientes de liberação lenta para a planta, o que pode ter possibilitado maior síntese de compostos clorofilados, porém, em outros parâmetros de crescimento isso não pode ser evidenciado.

Observou-se também que as mudas oriundas de embriões de sementes envelhecidas e cultivadas na fibra de coco apresentaram a razão clorofila A e B maior, em relação às advindas de embriões de sementes recém-colhidas (TABELA 11). Já no substrato Tropstrato as mudas de embriões de sementes recém-colhidas obtiveram maior valor.

Tabela 11 - Razão clorofila A e B de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com diferentes qualidades, aclimatizadas em diferentes substratos.

Nível de qualidade	Fibra de coco	Tropstrato
Recém colhida	2,31 Ab	2,48 Aa
Envelhecida	2,68 Aa	2,19 Ba

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

A razão entre as clorofilas A e B é amplamente utilizada na avaliação da quantidade de luz absorvida pelos complexos coletores de luz (BAOLI *et al.*, 2005). Segundo Lichtenthaler *et al* (1981) esse parâmetro está relacionado a uma adaptação do aparato fotossintético para uma melhor eficiência na captação da radiação.

Normalmente, esse parâmetro é observado em espécies vegetais na proporção de 3:1. Essa razão é normalmente menor em folhas em baixa irradiâncias, conforme descrito por Lichtenthaler *et al.* (2007). Por isso, espera-se uma redução na razão clorofila A e B como uma das principais respostas observadas em plantas desenvolvidas em ambiente com menor incidência luminosa (WALTERS, 2005), o que pode ser observado para todos os tratamentos realizados neste trabalho.

3.4 Análises de crescimento

A análise do crescimento constitui uma parte da fisiologia vegetal em que se faz uso de fórmulas e modelos matemáticos para avaliar índices de crescimento das plantas, sendo muito deles relacionados com a atividade fotossintética (BENINCASA, 2004).

De acordo com os resultados da análise de variância (ANEXO) dos dados das análises de crescimento, para as variáveis altura, diâmetro do caule e número de folhas houve interação dupla entre fatores de variação qualidade das sementes e tipos de substrato. Os diferentes tempos das avaliações não interagiram com outros fatores de variação, mas houve diferença significativa como fator isolado para as variáveis resposta altura, diâmetro do caule, número de folhas, taxa de crescimento absoluto caulinar (TCAC), taxa de crescimento absoluto em espessura caulinar (TCAEC) e taxa de crescimento absoluto em fitomassa fresca (TCAFFE).

Mudas advindas do cultivo *in vitro* de embriões de sementes recém-colhidas apresentaram maiores médias em altura, diâmetro do caule e número de folhas, do que as de sementes envelhecidas quando, em substrato fibra de coco (TABELA 12). Já no substrato Tropstrato não houve diferenças significativas entre os níveis de qualidade de sementes, exceto

para o diâmetro do caule, onde as mudas de sementes envelhecidas obtiveram maiores médias (TABELA 12).

Tabela 12 - Crescimento em altura, diâmetro do caule e número de folhas aos 150 dias de aclimatização de mudas de café advindas da cultura de embriões zigóticos de sementes com dois diferentes níveis de qualidade, em dois diferentes substratos.

	Altura (cm)		Diâmetro (mm)		Número de folhas	
	Fibra de coco	Tropstrato	Fibra de coco	Tropstrato	Fibra de coco	Tropstrato
Recém colhida	2,334 Aa	2,180 Ab	1,652 Aa	1,539 Bb	5,458 Aa	5,117 Aa
Envelhecida	1,988 Bb	2,181 Aa	1,513 Bb	1,652 Aa	4,717 Bb	5,258 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

O crescimento das plantas em altura nos diferentes tempos das avaliações apresentou aumento linear, mas sem diferenças para os fatores substrato e qualidade de sementes (FIGURA 1A). Já para o número de folhas, houve um aumento das medias até a quarta avaliação, aos 90 dias, após este período, o número de folhas diminuiu (FIGURA 1B). Para o diâmetro do caule, houve diminuição até os 90 dias, e após esse período, ele passou a aumentar (FIGURA 1C). Isso indica que as mudas a partir de 90 dias alocaram biomassa no caule ao invés das folhas nesse período.

Figura 1 - Crescimento em altura (A), número de folhas (B) e diâmetro do caule (C) de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes envelhecidas e recém colhidas. (continua...).

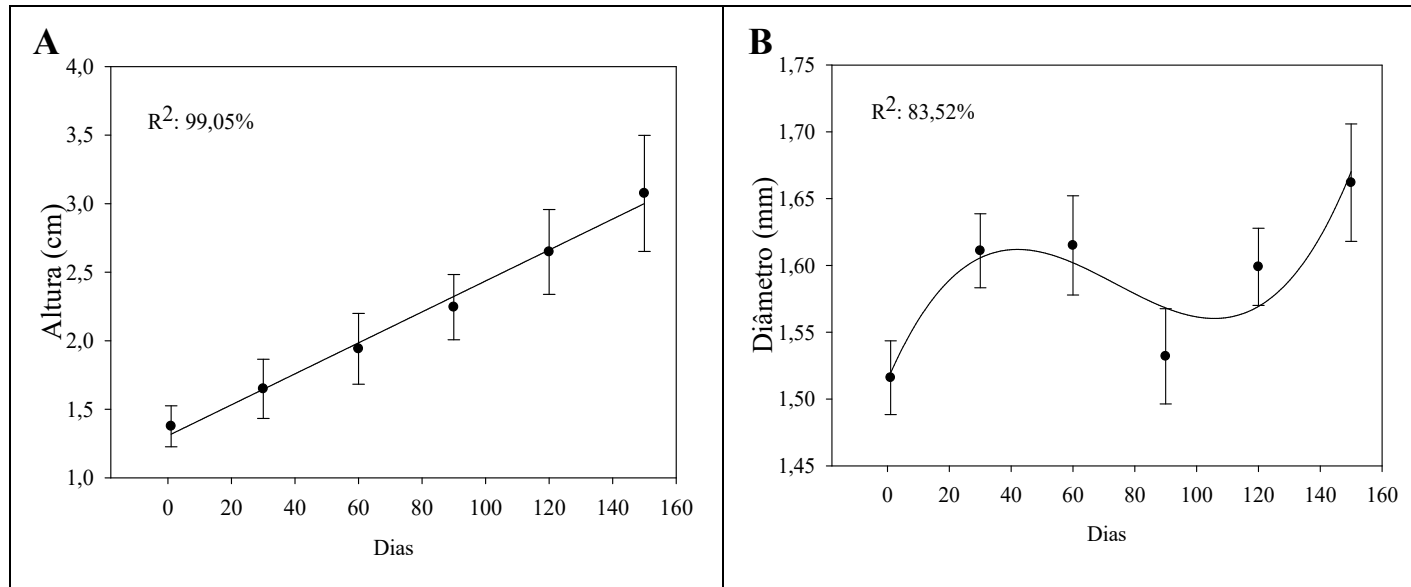
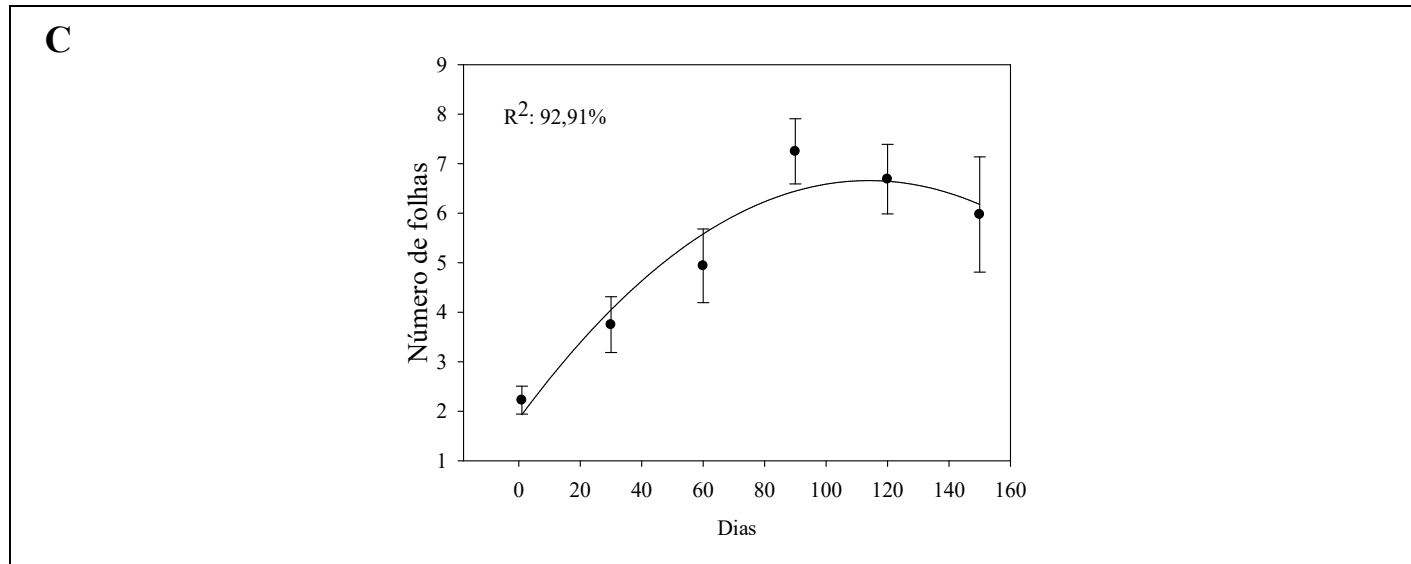


Figura 1 - Crescimento em altura (A), número de folhas (B) e diâmetro do caule (C) de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes envelhecidas e recém colhidas. (conclusão).



Fonte: Da autora (2020).

A taxa de crescimento absoluto caulinar indica o crescimento em milímetros de altura por dia, onde pode ser evidenciado um crescimento linear relacionado aos tempos da avaliação, sendo que os resultados das análises dessa taxa de crescimento demonstrou ser igual para as diferentes qualidades de sementes e diferentes substratos (FIGURA 2 A). A taxa de crescimento absoluto caulinar, também em mm por dia, evidencia que houve diminuição da espessura do caule até 90 dias e após esse período ocorreu um aumento (FIGURA 2 B). A taxa de crescimento absoluto em fitomassa fresca obtida pela variação em altura e diâmetro do caule (FIGURA 2 C), apesar da altura ter aumentado linearmente, a diminuição da espessura do caule foi bastante expressiva no acumulo da biomassa, pois o TCAFFE seguiu o mesmo padrão de distribuição, com queda até os 90 dias e posterior aumento, como ocorrido com as médias de crescimento do diâmetro do caule.

Figura 2 - Taxas de crescimento absoluto caulinar (A), taxa de crescimento absoluto em espessura caulinar (B) e taxa de crescimento absoluto em fitomassa fresca (C) de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes envelhecidas e recém colhidas. (continua...).

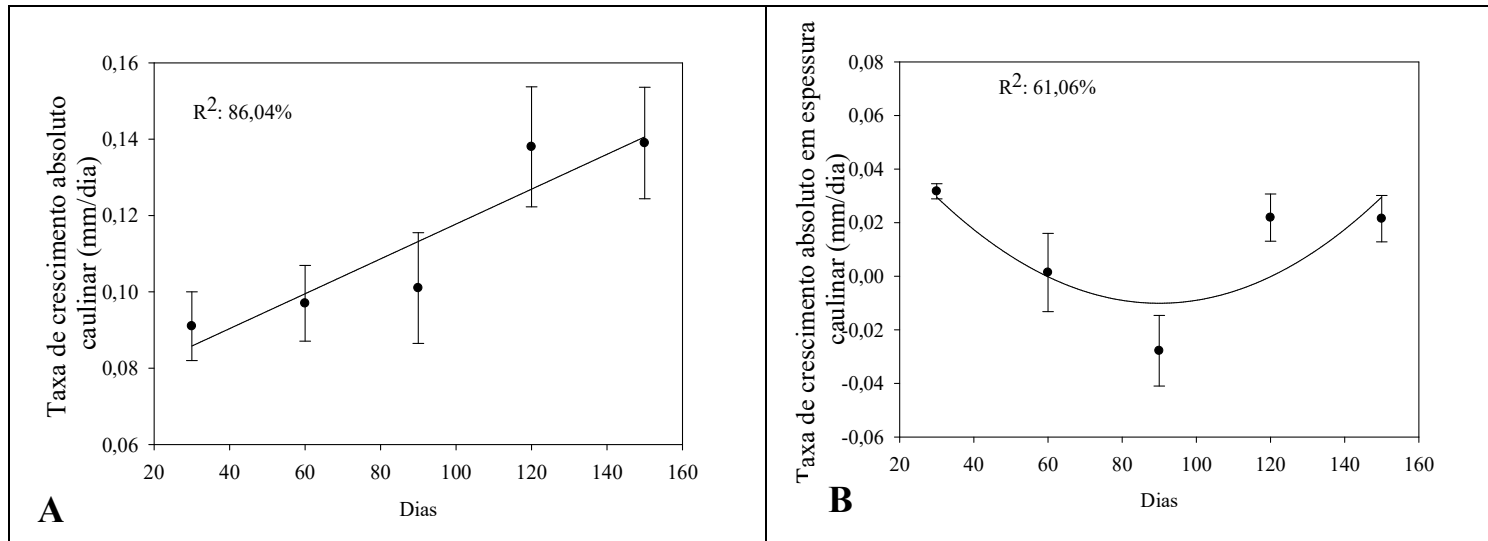
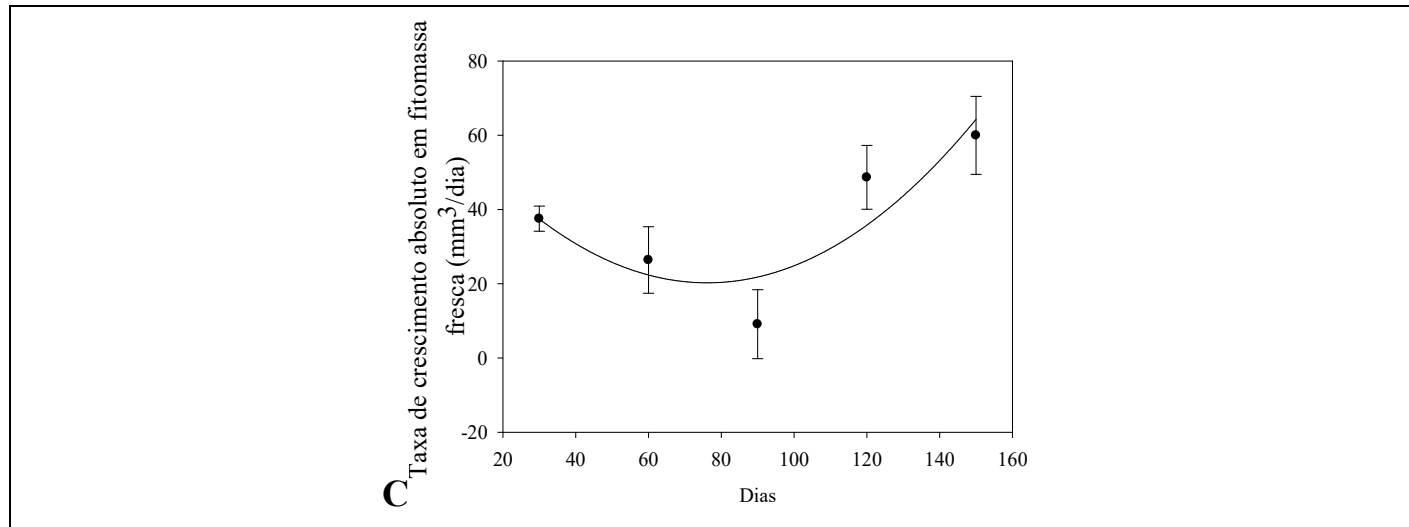


Figura 2 - Taxas de crescimento absoluto caulinar (A), taxa de crescimento absoluto em espessura caulinar (B) e taxa de crescimento absoluto em fitomassa fresca (C) de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes envelhecidas e recém colhidas. (conclusão).



Fonte: Da autora (2020).

3.5 Índice de velocidade de crescimento

De acordo com os resultados da análise de variância (ANEXO) do índice de velocidade de crescimento proposto por Edmond (1958), houve interação dupla entre os fatores ambientes e qualidades de sementes. Houve também significância estatística para o fator isolado substrato.

Quanto menor o valor do índice de velocidade (EDMOND; DRAPALA, 1958) de germinação ou de emergência, tem-se lotes de sementes com maior potencial fisiológico. Considerando que a velocidade de crescimento se baseia no princípio de que, quanto mais rapidamente a semente germina, maior é o seu vigor, pode-se inferir que as mudas em ambiente casa de vegetação apresentaram maior vigor (TABELA 13). Quanto ao efeito do fator qualidade das sementes, em câmara de crescimento, mudas de sementes recém-colhidas obtiveram menor desempenho, já em casa de vegetação, não houve diferenças entre mudas vindas de sementes envelhecidas ou de sementes recém-colhidas (TABELA 13). Isso mostra a potencialidade em se conseguir mudas com padrão melhor ou igual, quando advindas de embriões extraídos de sementes recém colhida ou sementes envelhecidas.

Tabela 13 - Índice de velocidade de crescimento em altura de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes com dois níveis de qualidade e cultivadas em dois ambientes.

Altura	Recém colhida	Envelhecida
Casa de vegetação	113,287 Aa	132,796 Aa
Câmara de crescimento	188,516 Ba	319,423 Bb

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas da linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

A aclimatização das mudas em substrato Tropstrato proporcionou maior índice de velocidade de crescimento, indicando que as mudas cultivadas nesse substrato precisaram de mais tempo para conseguirem alcançar sua maior altura (Tabela 14). O aumento em altura mais rápido em substrato fibra de coco pode melhorar o desempenho das mudas, aumentando seu vigor.

Tabela 14 - Índice de velocidade de crescimento em altura de mudas de café advindas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes cultivadas em dois diferentes substratos.

Substrato	Altura
Fibra de coco	166,135 a
Tropstrato	210,877 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

4 CONCLUSÕES

Mudas de café oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos se aclimatizam bem em casa de vegetação com nebulização.

O substrato fibra de coco é mais eficiente na aclimatização de mudas, tanto quando se originam de embriões zigóticos de sementes recém-colhidas, quanto de sementes envelhecidas.

É possível produzir mudas sadias de café, obtidas a partir de embriões zigóticos de sementes envelhecidas, com um padrão mínimo de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ASSIS B. P. *et al.* Growth response of four conilon coffee varieties (*Coffea canephora* Pierre ex a. froehner) to different shading levels. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 11, n. 7, 2019.
- BAOLI, D.; YANWEI, L.; CHUNYING, Y.; CHUNYANG, L. Morphological and physiological plasticity of woody plant in response to high light and low light. **Chin. J. Appl. Environ. Biol.**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 238-245, 2005.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de Crescimento de Plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: FUNEP, 2004. 42 p.
- BRAUN, H. *et al.* Produção de mudas de café conilon propagadas vegetativamente em diferentes níveis de sombreamento. **Idesia (Arica)**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 85-91, Dec. 2007.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMIG-ADAMS, B. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. *In: Ecophysiology of photosynthesis*. *In: SCHULZE, E.-D.; Caldwell, M.M. (eds.)*. New York: Springer, 1994. p.17-47.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BEARZOTTI, E. FALCO, L. Efeito do tratamento de sementes na emergência e desenvolvimento de mudas de cafeeiro *Coffea arabica* L¹. **Ciênc. e agrotec.**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 799-807, out./dez. 1999.
- 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.
- CRAVEN, D.; GULAMHUSSEIN, S.; BERLYN, G. P. Physiological and anatomical responses of *Acacia koa* (Gray) seedlings to varying light and drought conditions. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 60, p. 205-213, 2010.
- DARDENGO, M. C. J. D. *et al.* Crescimento e qualidade de mudas de café conilon produzidas em diferentes recipientes e níveis de sombreamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 4, p. 500-509, out./dez. 2013.
- DELOUCHE, J. C. An accelerated aging technique for predicting the relative storability of crimson clover and tall fescue seed lots. **Agronomy Abstracts 1965**, [s.l.], p. 40, 1965.
- DUZ, S. R.; SIMINSKI, A.; SANTOS, M.; PAULILO, M. T. S. Crescimento inicial de três espécies de arbóreas da Floresta Atlântica em resposta a variação na quantidade de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 587-596, 2004.
- EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seeds. **Proceedings of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 71, n. 2, p. 428-434, 1958.

- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- FAHL, J. I. *et al.* Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). **Journal of Horticultural Science**, [s.l.], v. 1, n. 69, p. 161-69, jan. 1994.
- FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. Uso do clorofiLOG como ferramenta para recomendação de adubação nitrogenada. **Revisão B.**, Porto Alegre, fev. 2008. 4 p. (Nota de Aplicação – CFL1030 - N.1.).
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A Computer Analysis System to Fixed Effects Split Plot Type Designs. **Revista Brasileira De Biometria**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Available at: <<http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>>. Date accessed: 10 feb. 2020.
- GONÇALVES, J. F. C.; MARENCO, R. A.; VIEIRA, G. Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light environments. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 149-157, 2001.
- GRIME, J. P.; CRICK, J. C.; RINCON, J. E. The ecological significance of plasticity. *In: Plasticity in Plants*. JENNINGS, D. H.; TREWAWAS, A. J. (eds.). The Company of Biologists, Cambridge, 1986. p 5-30.
- JOHNSON, J.D.; TOGNETTI, R.; MICHELOZZI, M.; PINZAUTI, S.; MINOTTA, G.; BORGHETTI, M. Ecophysiological responses of *Fagus sylvatica* seedlings to changing light conditions. 2. The interaction of light environment and soil fertility on seedling physiology. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v.101, p.124-134, 1997.
- KELLY, J.; JOSE, S.; NICHOLS, J. D.; BRISTOW, M. Growth and physiological response of six Australian rainforest tree species to a light gradient. **Forest Ecology and Management**, [s.l.], v. 257, n. 1, p. 287-293, 2009.
- KITAJIMA, K.; HOGAN, K. P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 26, p. 957-965, 2003.
- KITAO, M.; LEI, T.T.; KOIKE, T.; TOBITA, H.; MARUYAMA, Y. Susceptibility to photoinhibition of three deciduous broadleaf tree species with different successional traits raised under various light regimes. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v.23, p. 81-89, 2000a.
- KOZLOWSKI, T.T.; KRAMER, P. J.; PALLARDY, S. G. **The physiological ecology of woody plants**. San Diego: Academic Press, 1991.
- KWAK, M. J.; LEE, S. H.; WOO, S. Y. Growth and anatomical characteristics of different water and light intensities on a cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 53, p. 10964-10979, 2011.

KUMAR, D.; TIESZEN, L. L. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 13-19, jan. 1980.

LAGE-PINTO, F.; BERNINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; VITÓRIA, A. P. Photosynthetic analyses of two native Atlantic Forest species in regenerative understory of eucalyptus plantation. **Braz. J. Plant Physiol.**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 95-106, 2012.

LAMBERS, H.; CHAPIM III, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 2 ed. Berlin: Springer, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; DOLL, M.; FIETZ, H. J.; BACH, T.; KOZEL, U.; MEIER, D.; RAHMSDORF, U. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. **Photosynthesis Res.**, [s.l.], v. 2, p. 115-141, 1981.

LICHTENTHALER, H. K.; AC, A.; MAREK, M. V.; KALINA, J.; URBAN, O. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. **Plant physiology and biochemistry**, [s.l.], v. 45, p. 577-588, 2007.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E.; ACREE, T. E.; AN, H.; DECKER, E. A.; PENNER, M. H.; REID, D. S.; SCHWARTZ, S. J.; SHOEMAKER, C. F.; SPORNS, P. (eds.). **Current protocols in food analytical chemistry (CPFA)**. New York: John Wiley & Sons, F4.3.1-F4.3.8, 2001.

MARANA, J. P.; MIGLIORANZAN, E.; FONSECA, E. P.; KAINUMA, R. H. Índices de qualidade e crescimento de mudas de café produzidas em tubetes. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.38, n.1, p.39-45, jan-fev, 2008.

MARCUZZO, K. V.; MELO, B.; CARVALHO, H. P.; TEODORO, R. E. F.; SEVERINO, G. M.; ALVARENGA, C. B. Desenvolvimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em diferentes substratos e doses e fertilizantes de liberação gradual. **Bioscience J.**, Uberlândia, v.21, n.1, p. 57-63, 2005.

MARTINAZZO, E. G.; ANESE, S.; WANDSCHEER, A. C. D.; PASTORINI, H. Efeito do sombreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila foliar de *Eugenia uniflora* Linn (pitanga) – família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 162-164, 2007.

MAXIMIANO, A. R.; DOMINGUES, P. F.; VALLONE, H. S.; NETO, J. A. F.; MACHADO, L. J. M. Aplicação foliar de Biofertilizantes em mudas de cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 7., [s.l.]. **Anais [...]**, 2011.

OGUCHI, R.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 26, p. 505–512, 2003.

- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de Tecidos**. Lavras: UFLA FAEPE, 2001. 97 p.: il.
- POORTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. **Aust. J. Plant Physiol.**, [s.l.], v. 27, p. 595-607, 2000.
- POORTER, H.; NIKLAS, K. J.; REICH, P. B.; OLEKSYN, J.; POOT, P.; MOMMER, L. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. **New Phytologist**, [s.l.], p. 1-21, 2011.
- PORTES, M. T.; DAMINELLI, D. S. C.; RIBEIRO, R.V.; MONTEIRO, J. A. F.; SOUZA, G. M. Evidence of higher photosynthetic plasticity in the early successional *Guazuma ulmifolia* Lam. compared to the late successional *Hymenaea courbaril* L. grown in contrasting light environments. **Braz. J. Biol.**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 75-83, 2010.
- POWLES, S. B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Annual Review of Plant Physiology**, [s.l.], v. 35, p. 15-44, 1984.
- REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do jequitibá-rosa. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n. 53, p. 179-194, 2006.
- REYES, T.; NELL, T. A.; BARRETT, J. E.; CONOVER, C. A. Testing the light acclimatization potential of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Hort. **Science**, [s.l.], v. 31, n. 7, p. 1203-1206, 1996.
- REZENDE, J. C. et al. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 30-37, jan./jun. 2008.
- ROSA, S. D. V. F.; MELO, L. Q.; VEIGA, A. D.; OLIVEIRRA, S., SOUZA, C. A. S.; AGUIAR, V. A. Formação de mudas de *Coffea arabica* L. cv. Rubi utilizando sementes ou frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 349-356, mar./abr. 2007.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.110-119, 2004.
- SANTOS, M. R. A. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology and Biology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 12-19, 2014.
- SCHLICHTING, C. D.; PIGLIUCCI, M. **Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.
- SILVA, C. J.; MELO, B.; SILVA, C. A.; VIEIRA, Z. L.; COSTA, R. A. Desenvolvimento de mudas de cafeeiro sob doses de materiais orgânicos misturados ao substrato. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 17., [s.l.]. **Anais [...]**, [s.l.], 2009.

SILVESTRINE, M.; VÁLIO, I. F. M.; MATTOS, E. A. Photosynthesis and carbon gain under contrasting light levels in seedlings of a pioneer and a climax tree from a Brazilian semideciduous Tropical Forest. **Revista Brasil. Bot.**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 463-474, jul./set. 2007.

SOARES, M. G. **Plasticidade fenotípica de plantas jovens de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) em resposta a radiação solar.** 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, ES, 2012.

SOUZA, G. M.; RIBEIRO, R. V.; SATO, A. M.; OLIVEIRA, M. S. Diurnal and seasonal carbon balance of four tropical tree species differing in successional status. **Brazilian Journal Biology**, [s.l.], v. 68, p. 781-793, 2008.

SOUZA, R. P.; VÁLIO, I. F. M. Seedling growth of fifteen Brazilian tropical tree species differing in successional status. **Revista Brasileira de Botânica**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 35-47, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

THOMAZIELLO, R. A.; FAZUOLI, L. C.; PEZZOPANE, J. R. M.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. **Café arábica: cultura e técnicas de produção.** Campinas: Instituto Agronômico, 2000. 82 p. (Boletim Técnico, 187).

TRISTÃO, F. S. M. Produção de mudas micorrizadas de cafeeiro em diferentes substratos orgânicos. 2005. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Instituto Agronômico, Campinas, São Paulo, SP, 2005.

VIEIRA, T. O. Plasticidade fenotípica e aclimação de *Siparuna guianensis* em resposta a gradiente de luz. 2013. Dissertação (Mestrado Ecologia de Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, 2013. 89 p.

WALTERS, R. G. Towards and understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 56, p. 435-447, 2005.

ANEXOS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para altura, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e razão raiz parte aérea de mudas de *Coffea arabica* L., provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes de diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois diferentes substratos e dois diferentes ambientes.

Fatores de variação	Altura	Diâmetro	Número de folhas	Área foliar	MS PA	MA R	MSPA/MSR
Ambientes	*	*	**	*	**	**	**
Níveis de qualidade	**					**	*
Substratos							*
Ambientes *Níveis de qualidade					*		*
Ambientes *Substratos							
Níveis de qualidade *Substratos						**	**
Ambientes *Níveis de qualidade *Substratos					**	**	*
Bloco							
CV	17,49	21,02	15,63	31,4	28,92	32,75	58,84

*Significativo ($p>0,5$); ** Muito significativo ($p>0,1$).

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para os índices de clorofila A, clorofila B, clorofila total e razão clorofila A e B de mudas de *Coffea arabica* L., provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes de diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois diferentes substratos e dois diferentes ambientes.

Fatores de variação	Clorofila A	Clorofila Total	Clorofila B	Razão clorofila a e b
Ambientes		*	*	
Níveis de qualidade		*		*
Substratos		*	*	*
Ambientes *Níveis de qualidade				
Ambientes *Substratos				
Níveis de qualidade *Substratos				
Ambientes *Níveis de qualidade *Substratos				
Bloco				
CV	13,92	12,93	15,18	14,23

*Significativo ($p>0,5$); ** Muito significativo ($p>0,1$).

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para altura, diâmetro do caule, número de folhas, TCAC, TCAD, TCAFFE de mudas de *Coffea arabica* L., provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes de diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois diferentes substratos.

FV Análises de crescimento	Altura	Diâmetro	Número de folhas	TCAC	TCAD	TCAFFE
Avaliação	**	**	**	*	*	**
Níveis de qualidade	**		*			*
Substrato						
Avaliação x Níveis de qualidade						*
Avaliação x Substrato						
Níveis de qualidade X Substrato	*	**	**			
Avaliação x Níveis de qualidade x Substrato						
Bloco	**	*	**			
CV	8,61	7,01	12,5	45,26	44,75	85,38

*Significativo ($p>0,5$) ** Muito significativo ($p>0,1$).

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para Índice de velocidade de crescimento de mudas de *Coffea arabica* L., provenientes do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de sementes de diferentes níveis de qualidade, aclimatizadas em dois diferentes substratos e dois diferentes ambientes.

FV	Índice de velocidade de crescimento
Ambientes	**
Níveis de qualidade	**
Substrato	*
Avaliação x Níveis de qualidade	*
Avaliação x Substrato	
Níveis de qualidade X Substrato	
Avaliação x Níveis de qualidade x Substrato	
Bloco	
CV	30,85

*Significativo ($p>0,5$) ** Muito significativo ($p>0,1$).

Fonte: Da autora (2020).