

DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES OBTIDOS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA DE *Coffea arabica* L. CV. ACAIÁ CERRADO

DEVELOPMENT AND MULTIPLICATION *in vitro* OF EMBRYO OBTAINED BY DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Coffea arabica* L. CV. ACAIÁ CERRADO

Alba Regina Pereira RODRIGUES¹; Filipe Almendagna RODRIGUES²; Moacir PASQUAL³;
José Magno Queiroz LUZ⁴

1. Professora, Doutora, Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, Valença, RJ, Brasil. albacet@gmail.com; 2. Pós-doutorando em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, Brasil. filipealmendagna@yahoo.com.br; 3. Professor Titular, Doutor, UFLA, Lavras, MG, Brasil. mpasqual@dag.ufla.br; 4. Professor, Doutor, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. jmagno@umarama.ufu.br.

RESUMO: Um importante método de multiplicação *in vitro* de plantas de *Coffea* é a embriogênese somática, que consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células haplóides ou somáticas possibilitando a micropropagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos. Entretanto, há poucos relatos da obtenção de embriogênese direta na espécie *Coffea arabica*. Objetivou-se com este trabalho estabelecer protocolo para desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos e produção de mudas de *C. arabica* cultivar Acaiá Cerrado. Avaliaram-se a influência de sacarose (0; 30; 60; 90 e 120 g L⁻¹) x BAP (0; 2; 4 e 8 mg L⁻¹) em embriões somáticos. No desenvolvimento das plântulas, testaram-se ANA (0; 0,25; 0,5 e 1mg L⁻¹) x GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10 e 20 mg L⁻¹) em brotações, com tamanho médio de 1 a 1,5 cm, oriundas de embriões somáticos *in vitro*. Durante a etapa de indução de embriões, o experimento foi conduzido em sala de crescimento em condições de escuro e, na etapa de desenvolvimento dos embriões e plântulas, os explantes foram submetidos à irradiância em torno de 32 μM m² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 25 ± 1 °C. Na aclimatização, avaliou-se o efeito da presença e ausência de raízes em plântulas de cafeeiro oriundas de embriogênese somática direta. A adição de 90 g L⁻¹ de sacarose e 2 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura proporciona melhor crescimento *in vitro* de embriões de cafeeiro. Utilizando-se 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 14,2 mg L⁻¹ de GA₃ obtém-se maior comprimento da parte aérea de brotações de *C. arabica* L. cv. Acaiá Cerrado. Conclui-se que é possível a obtenção de plântulas micropropagadas de *C. arabica* L. cultivar Acaiá Cerrado pela embriogênese somática direta. O enraizamento de brotações de cafeeiro cultivar Acaiá Cerrado ocorre simultaneamente ao processo de aclimatização.

PALAVRAS-CHAVE: Embriões somática. Cafeeiro. Aclimatização.

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea*, pertencente à família Rubiaceae, compreende mais de 100 espécies, que ocorrem naturalmente na África, Madagascar, Ilhas Comores, Ilhas Mascarenhas, subcontinente indiano, Ásia sul tropical, sudeste da Ásia e Australásia (DAVIS et al., 2006; DAVIS, 2010, 2011; DAVIS et al., 2011).

A espécie *Coffea arabica* se reproduz, preponderantemente, por autofecundação e é comercialmente propagado por semente. As estratégias de melhoramento genético visam ao desenvolvimento de cultivares altamente homocigotos para que, por sementes, sejam instalados lavouras uniformes (MEDINA FILHO et al., 2008).

Contudo, a utilização da embriogênese somática em plantas do gênero *Coffea* é um importante método de multiplicação *in vitro*, que consiste no desenvolvimento de embriões a partir

de células haplóides ou somáticas diplóides, sem que haja a fusão de gametas, e que possibilita micropropagação acelerada de clones superiores e a manutenção de híbridos interespecíficos (PEREIRA et al., 2007). Além disso, a embriogênese somática apresenta grande potencial para a multiplicação rápida e em larga escala de variedades selecionadas em uma ampla gama de espécies economicamente importantes (LANDEY et al., 2013).

Segundo Pereira et al. (2007), as auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies vegetais, a exemplo do cafeeiro, que é comum a adição do 6-benzilaminopurina (BAP) para aumentar o crescimento da parte aérea de embriões somáticos em fase inicial de germinação. Porém, em algumas espécies torna-se necessário a suplementação do meio de cultura com ácido giberélico (GA₃) para o desenvolvimento de embriões somáticos, pois o GA₃ participa de muitas atividades fisiológicas

importantes, tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento caulinar.

Sendo assim, objetivou-se com este trabalho estabelecer protocolo para desenvolvimento e multiplicação *in vitro* de embriões somáticos e produção de mudas de *Coffea arabica* cultivar Acaíá Cerrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Fase de cultivo *in vitro*

No preparo dos meios de cultura foram utilizadas soluções estoque do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) armazenadas em frascos de vidro escuro, à temperatura de aproximadamente 5°C. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, com NaOH 0,5 e 0,1 N ou HCl 0,1 N, antes da adição de 6 g L^{-1} de ágar. Os meios foram vertidos em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm), vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,1atm e à temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

Segmentos foliares retirados de plântulas de *Coffea arabica* cultivar Acaíá Cerrado foram introduzidos, em câmara de fluxo laminar horizontal desinfestada com álcool etílico a 70%, em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura para indução de embriões somáticos (PEREIRA et al., 2007). Os instrumentos (pinças e bisturis) foram autoclavados e periodicamente flambados, durante o seu uso, com álcool etílico hidratado 96°GL. Logo após, os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Avaliação dos experimentos

Para a avaliação dos experimentos foram utilizadas: a) lupa estereoscópica, na determinação do número e estádios de desenvolvimento dos embriões, b) balança analítica de precisão, na determinação da massa fresca da parte aérea das plântulas e c) régua graduada, na determinação do comprimento da parte aérea das plântulas.

Os fatores dos experimentos foram analisados por meio de regressão polinomial, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Foi adotado o seguinte modelo estatístico: $Y_{ijk} = m + ai + bk + abik + e_{ijk}$, em que, Y_{ijk} : valor observado na dose do fitorregulador i , dose do

fitorregulador k e repetição j ; m : média geral; ai : efeito da dose do fitorregulador i ; bk : efeito da dose do fitorregulador k ; $abik$: efeito da interação entre a dose do fitorregulador i e a dose do fitorregulador k ; e_{ijk} : erro experimental na parcela i, j, k .

Desenvolvimento de embriões somáticos

Embriões somáticos de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado foram mantidos durante 30 dias em meio MS com 100% dos sais, objetivando sua homogeneidade. Em seguida foram transferidos para meio MS com 50% dos sais acrescido de todas as combinações possíveis de BAP (0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L^{-1}) e sacarose (0; 30; 60; 90 e 120 g L^{-1}), 100 mg L^{-1} de caseína hidrolisada e 400 mg L^{-1} de extrato de malte.

Os embriões foram introduzidos *in vitro* individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura e mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de $32 \mu\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, com quatro repetições de três tubos cada. Após 90 dias, o experimento foi avaliado em função de número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca da parte aérea.

Multiplicação

Brotos de *Coffea arabica* cv. Acaíá Cerrado oriundos de plântulas provenientes de embriões somáticos obtidos por via direta, foram seccionados com 1 a 1,5 cm de comprimento estabelecidos *in vitro* durante 60 dias em meio MS com 100% dos sais e acrescido de 8 mg L^{-1} de BAP, objetivando sua homogeneidade. Em seguida foram transferidos para meio MS 50% acrescido de todas as combinações possíveis de GA₃ (0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg L^{-1}) e ANA (0; 0,25; 0,50; 1,0 mg L^{-1}).

Os explantes foram introduzidos *in vitro* individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura e mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de $32 \mu\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, com quatro repetições de três tubos cada. Após 60 dias, o experimento foi avaliado em função de número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca da parte aérea.

Enraizamento e aclimatização de plântulas

Após o período de multiplicação, segmentos nodais foram inoculados em meio MS com 100% dos sais, suplementado com diferentes

concentrações de AIB (0, 10 e 50 mg L⁻¹). Os explantes permaneceram em sala de crescimento por 35 dias e, após este período, foram divididos em três tratamentos: 1) plântulas com raízes, oriundas de meio 'MS + AIB 10 mg L⁻¹' (CRAIB), 2) plântulas sem raízes, oriundas de meio 'MS' (SR-MS) e plântulas imersas em solução contendo AIB na concentração de 50 mg L⁻¹ por 20 horas (SR-AIB).

Após o tratamento, foram transferidas para bandejas de isopor contendo Plantmax hortaliçasT como substrato e mantidos em casa de vegetação. O fornecimento de minerais foi feito por meio da aplicação semanal de 1mL do meio MS líquido, com 100% dos sais por plântula, iniciado no dia do plantio e estendendo-se até o final do experimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e cinco plantas por parcela. Os dados foram submetidos à análise estatística.

Após a análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Foi adotado o seguinte modelo estatístico: $Y_{ij} = m + ai + e_{ij}$, em que, Y_{ij} : valor observado na parcela para o tratamento i na repetição j ; m : média geral; ai : efeito do tratamento i ; e_{ij} : erro experimental na parcela i,j .

Após 80 dias, as plântulas foram avaliadas em função das seguintes variáveis: número de pares de folhas, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e massa fresca total.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento de embriões somáticos

Através da análise de variância, verificou-se para as características número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca de parte aérea de plântula de *C. arábica* cv. Acaíá Cerrado interação significativa entre os fatores sacarose e BAP analisados em nível de 1% de probabilidade.

Número de folhas

O maior número de folhas (3,8) foi obtido com 5,9 mg L⁻¹ de BAP associado a 90 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1). A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido à elevação do potencial osmótico no meio de cultura. A alta concentração de sacarose afeta a assimilação de nutrientes e o efeito de reguladores de crescimento (PASQUAL, 2001).

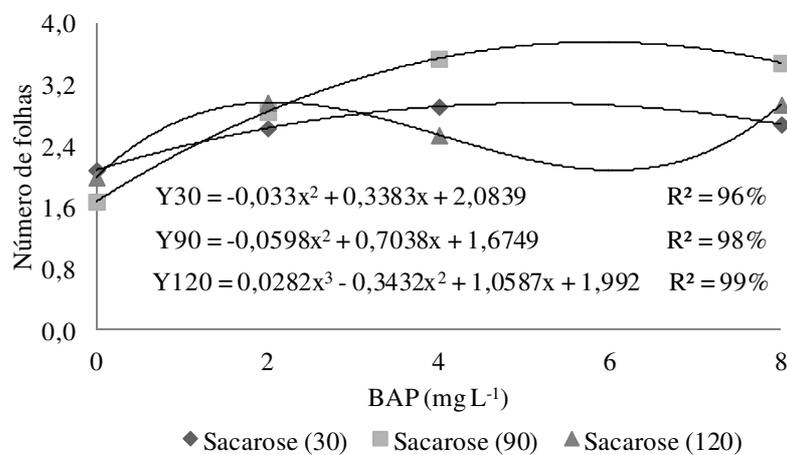


Figura 1. Efeito de concentrações de BAP e sacarose no número de folhas da *C. arábica* cv. Acaíá Cerrado.

Segundo Sharp et al. (1980), a concentração de sacarose é um fator importante para o cultivo de embriões e, na fase de desenvolvimento, estes necessitam de concentrações elevadas de sacarose (90 a 120 g L⁻¹). À medida que aumentaram as concentrações de BAP, até a concentração de 5,9 mg L⁻¹, combinadas às concentrações de 30 e 90 g L⁻¹ de sacarose, um incremento no número de folhas foi observado (Figura 1). Porém, Hu; Ferreira (1998) afirmam que os reguladores de crescimento não necessitam ser adicionados ao meio de cultura de embriões, exceto quando o objetivo do trabalho é

a multiplicação rápida. Em contrapartida, Ribeiro et al. (2003), estudando o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *C. arábica* cv. Catuaí Vermelho obtiveram os melhores resultados para número de folhas quando adicionaram ao meio de cultura 7,4 mg L⁻¹ de BAP.

Comprimento da parte aérea

Maior comprimento da parte aérea (2,78 cm) foi obtido com 2 mg L⁻¹ de BAP associado a 90 g L⁻¹ de sacarose, observando-se menores valores quando foram utilizadas concentrações entre 2,1 e 6

mg L⁻¹ de BAP (Figura 2). Esses resultados estão de acordo com Pasqual (2001), que comenta que altas concentrações de citocininas podem reduzir o

comprimento das brotações e estimular a ocorrência de vitrificação.

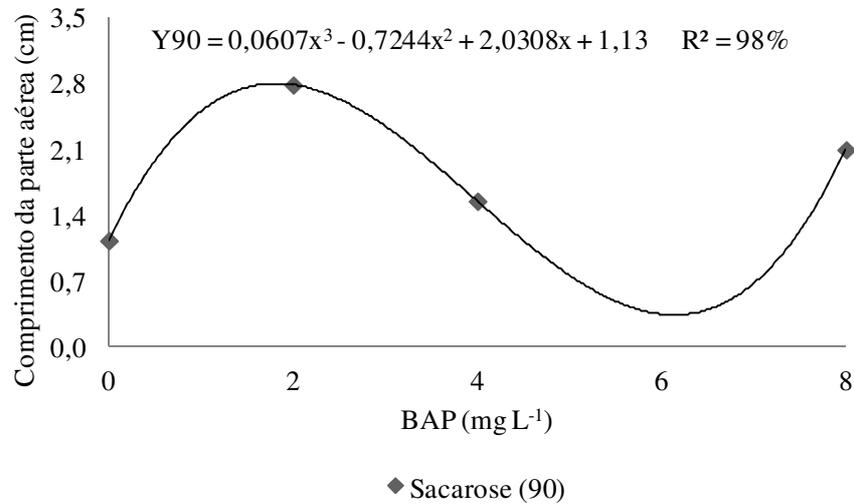


Figura 2. Efeito de concentrações de BAP e sacarose no comprimento da parte aérea de embriões somáticos da *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado.

Massa fresca da parte aérea

À medida que aumentaram as concentrações de BAP, na ausência de sacarose, maior massa fresca da parte aérea (1,14 g) foi observada (Figura 3). Utilizando-se 30 g L⁻¹ de sacarose podem-se observar menores valores quando foram adicionadas

concentrações mais altas do fitorregulador. Segundo Hu; Ferreira (1998), de maneira geral, quanto mais jovem for o embrião, mais alta será a osmolaridade requerida do meio de cultura e, na maturidade, o embrião pode crescer em meio de cultura desprovido de sacarose.

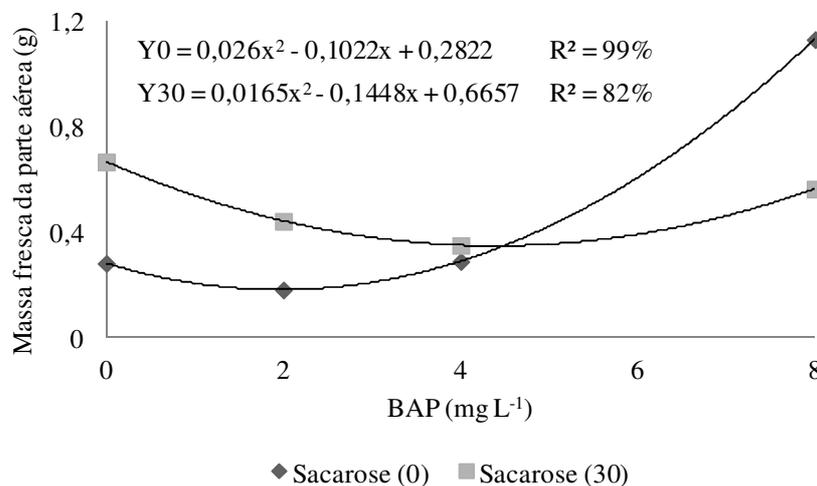


Figura 3. Efeito de concentrações de BAP e sacarose na massa fresca da parte aérea de embriões somáticos da *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado.

Multiplicação de plântulas de cafeeiro

Através da análise de variância para as características número de folhas, comprimento da parte aérea e massa fresca de parte aérea de plântula de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado observou-se interação significativa entre os fatores sacarose e BAP analisados em nível de 1% de probabilidade.

Verificou-se, por meio da análise de variância, interação significativa a 1% de probabilidade entre os reguladores de crescimento GA₃ e ANA para as variáveis número de folhas e comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* cv. Acaíá Cerrado.

Número de folhas

Maior número de folhas (7,1) foi obtido quando foram utilizados $11,5 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 na ausência de ANA (Figura 4). A partir desse ponto houve redução no número de folhas, provavelmente devido ao efeito fitotóxico desse regulador de crescimento. Na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de

ANA na ausência de GA_3 , obtiveram-se explantes com 7 folhas. Como não há diferença significativa no número de folhas, justifica-se utilizar $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, que é o regulador de crescimento de menor custo. Na concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, combinada com 5 mg L^{-1} de GA_3 , foram observadas 6 folhas.

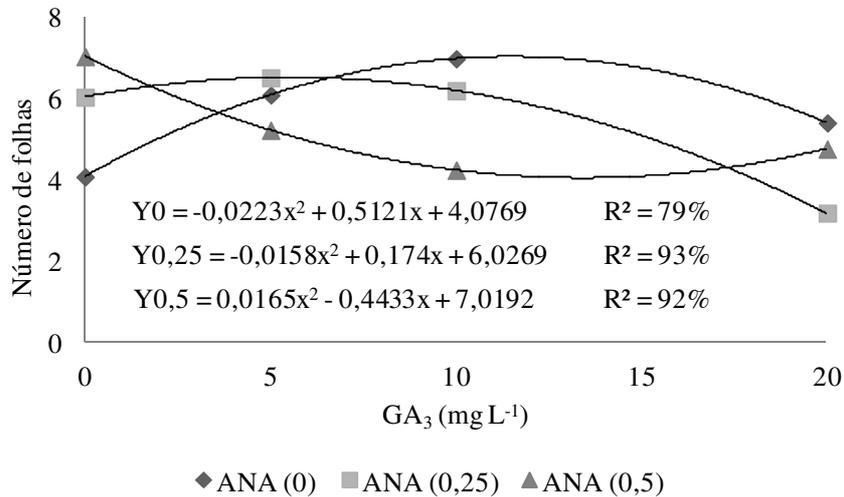


Figura 4. Efeito de concentrações de ANA e GA_3 no número de folhas de plântulas de *C. arabica* cv. Acaia Cerrado.

Já Andrade et al. (2001), trabalhando com embriões zigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho, observaram melhores resultados para o número de folhas com a utilização de 1 mg L^{-1} de ANA.

Altas concentrações de GA_3 , independentemente das concentrações de ANA, proporcionaram folhas alongadas, estreitas e retorcidas (Figura 5).

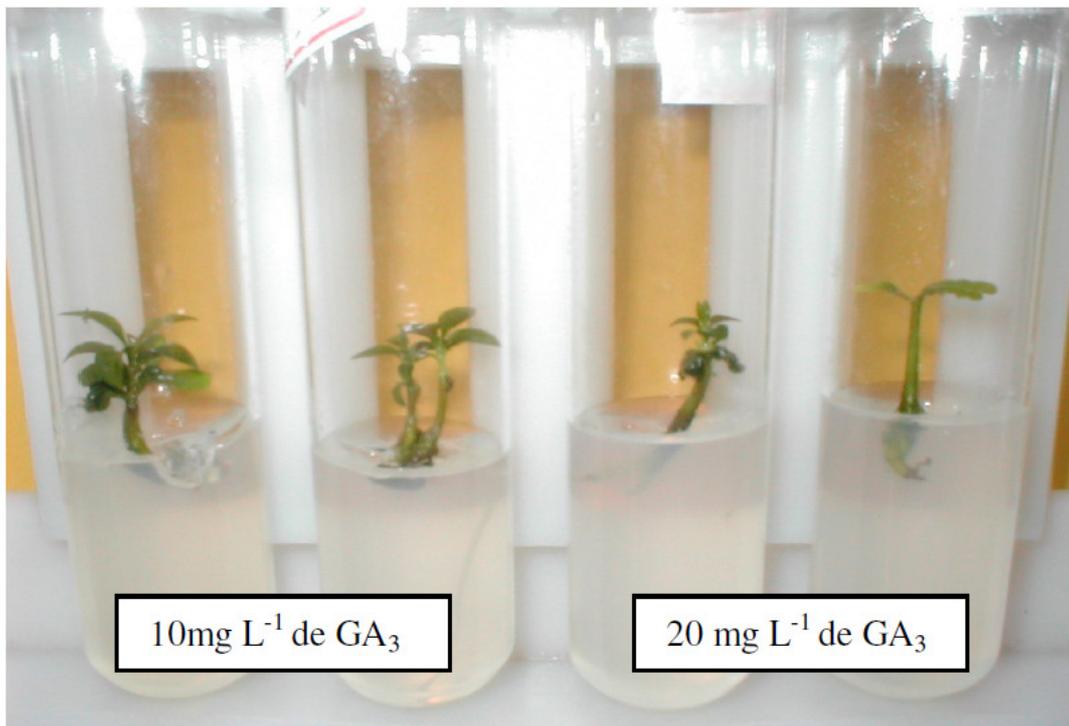


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de GA_3 em plântulas de café cv. Acaia Cerrado.

Comprimento da parte aérea

Melhor resultado para comprimento da parte aérea (2,75 cm) foi obtido com a utilização de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 14,2 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 6).

Entretanto, na ausência de ANA associada a 20 mg L⁻¹ de GA₃ obtiveram-se plântulas de cafeeiro com 2,55 cm. O incremento das concentrações de GA₃ na ausência de ANA promoveu aumento no comprimento da parte aérea. Por outro lado, Andrade et al. (2001) obtiveram melhor resultado

para comprimento da parte aérea de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho quando adicionaram, ao meio de cultura, 1 mg L⁻¹ de ANA.

Observa-se que, com a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de ANA, houve um decréscimo no comprimento de plântulas com a adição de concentrações superiores a 14,5 mg L⁻¹ de GA₃, provavelmente, devido ao efeito fitotóxico desse regulador.

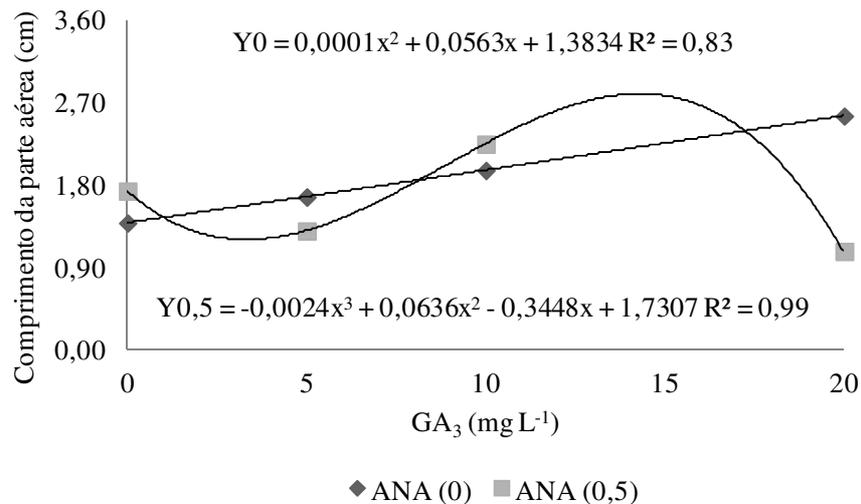


Figura 6. Efeito de concentrações de ANA e GA₃ no comprimento da parte aérea de plântulas de *C. arabica* cv. Acaia Cerrado.

Há poucos relatos da obtenção de embriogênese somática direta em *C. arabica*. Entretanto, *C. canephora* tem sido utilizada como espécie modelo para o emprego dessa técnica. Esta diferença de resposta entre espécies, aliada à baixa frequência de formação de embriões, indica que alguns problemas ainda precisam ser resolvidos antes do uso prático da micropropagação via embriogênese direta em cafeeiro. Portanto, para a utilização em larga escala, pesquisas ainda são necessárias para desenvolver protocolos de embriogênese direta que permitam aumentar a amplitude de genótipos capazes de produzir embriões somáticos em alta frequência e estabilidade genética do genótipo do doador.

Massa fresca da parte aérea

Para a variável massa fresca da parte aérea de plântulas, houve efeito significativo apenas para o efeito isolado do ANA, contudo, não ocorreram interação significativa entre as concentrações de ANA e GA₃ e significância para efeito isolado do GA₃. Melhor resultado (0,079 g) foi verificado quando se utilizou 0,75 mg L⁻¹ de ANA (Figura 7),

entretanto, na ausência desse mesmo fitorregulador, foram obtidos 0,060g. Nesse caso, justifica-se utilizar o meio de cultura com a ausência do fitoregulador ANA, com o objetivo de redução de custos. Já Andrade et al. (2001), estudando embriões zigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho, obtiveram melhores resultados para massa fresca com a adição de 0,53 mg L⁻¹ de ANA ao meio de cultura.

Aclimatização de plântulas

Presença ou ausência de raízes na aclimatização de plântulas

Houve efeito significativo apenas para a variável massa fresca total, porém as variáveis número de pares de folhas, comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz não apresentaram diferença significativa. Isso implica que a utilização de AIB, *ex vitro* ou *in vitro*, para o enraizamento de plântulas de cafeeiro, é desnecessária para incrementar o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e raízes. Observou-se que houve 100% de enraizamento em todos os tratamentos testados (Figura 8). Esse

comportamento está de acordo com Carvalho et al. (1999) que, estudando a aclimatização de cafeeiro

cv. Acaiaí observou que não havia necessidade do enraizamento *in vitro* com a utilização de AIB.

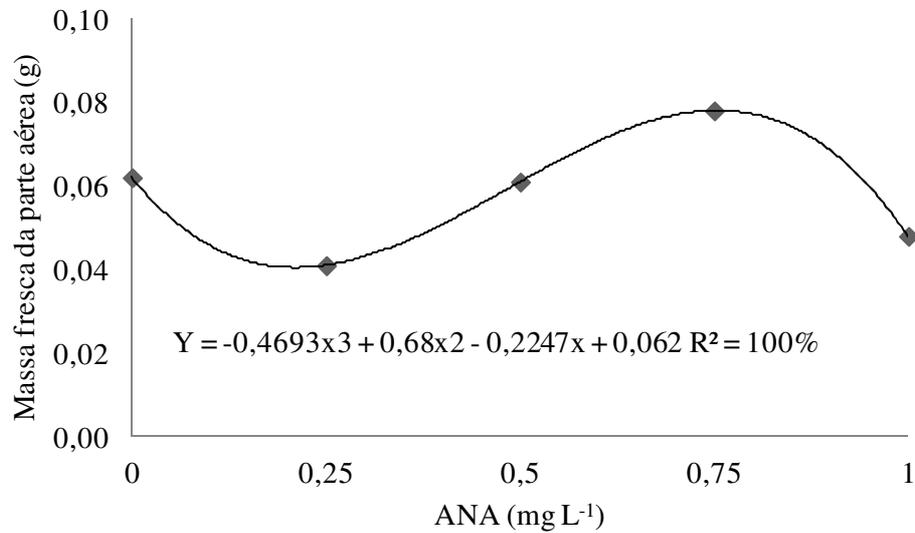


Figura 7. Efeito de concentrações de ANA na massa fresca da parte aérea de plântulas de *C. arabica* cv. Acaiaí Cerrado.

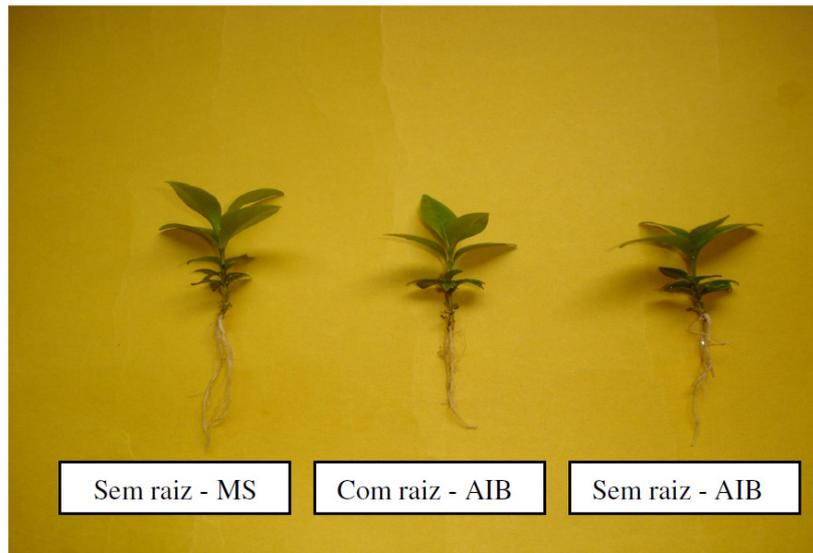


Figura 8. Efeito de AIB e presença ou ausência de raízes de plântulas de *C. arabica* cv. Acaiaí Cerrado.

Segundo George (1996), apesar do interesse para a aclimatização de plântulas enraizadas *in vitro*, tem-se observado que as raízes formadas nesta condição não se tornam suficientemente desenvolvidas para estimular o crescimento de plantas lenhosas. Além disso, o enraizamento *in vitro* é extremamente indesejável sob o aspecto econômico, pois o gasto nessa fase apenas se justifica caso este resulte em plântulas de melhor qualidade final ou se perdas durante a aclimatização puderem ser reduzidas.

Massa fresca total

Melhor resultado para massa fresca total (0,341 g) foi obtido quando aclimatizaram-se brotações sem raízes (Tabela 1). Provavelmente, devido à regeneração de raízes diretamente no substrato, tende-se a produzir um sistema radicular mais completo e funcional. Porém, o sistema radicular formado *in vitro* é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares,

o que dificulta a absorção de água e nutrientes durante a aclimatização.

Tabela 1. Efeito de AIB e presença ou ausência de raízes na massa fresca total de plântulas de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado.

Tratamentos	Massa fresca total (g)
SR-MS (sem raiz +MS)	0,341 a
CR-AIB (com raiz + AIB)	0,273 b
SR-AIB (sem raiz + AIB)	0,202 c

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

O enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, com a utilização de AIB, não contribuiu para o incremento de massa fresca total de plântulas de cafeeiro cv. Acaiá Cerrado. Embora o AIB seja a auxina mais utilizada na indução de enraizamento, misturas de diferentes auxinas têm apresentado melhores resultados do que quando utilizadas isoladamente (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Segundo Carvalho et al. (1999), a imersão de brotações de cafeeiro em solução contendo AIB prejudica o desenvolvimento das plântulas durante a fase de aclimatização.

CONCLUSÕES

É possível a obtenção de plântulas micropropagadas de *Coffea arabica* L. cultivar Acaiá Cerrado pela embriogênese somática direta.

O enraizamento de brotações de cafeeiro cv. Acaiá Cerrado ocorre simultaneamente ao processo de aclimatização.

A utilização do AIB, na fase de enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, não contribuiu para o incremento de massa fresca total de plântulas de cafeeiro cv. Acaiá Cerrado.

ABSTRACT: An important method of *in vitro* plant's multiplication of *Coffea* is somatic embryogenesis, which consists in developing embryoid from haploid or diploid somatic cells, without the fusion of gametes allowing the accelerated micropropagation and maintenance of superior clones interspecific hybrids. However there are few reports of direct embryogenesis in *Coffea arabica*. The objective of this work to establish protocol for *in vitro* development of somatic embryos and seedlings of *C. arabica* Acaiá Cerrado. The influence of sucrose (0, 30, 60, 90 and 120 g L⁻¹) x BAP (0, 2, 4 and 8 mg L⁻¹) on somatic embryos from embryogenic were evaluated. In seedling development, NAA (0, 0.25, 0.5 and 1 mg L⁻¹) x GA₃ (0, 2.5, 5.0, 10 and 20 mg L⁻¹) in shoots were tested, with average size of 1 to 1.5 cm, derived from somatic embryos *in vitro*. During the development stage of embryos and embryonic seedling induction, the experiment was conducted in a growth chamber under conditions of darkness and the stage of development of embryos and seedlings, the explants were subjected to irradiation around 32 mM m⁻² s⁻¹ and a photoperiod of 16 hours at a temperature of 25 ± 1 ° C. In acclimatization, the effect of the presence and absence of roots in coffee seedlings originating from direct somatic embryogenesis were evaluated. The addition of 90 g L⁻¹ sucrose and 2 mg L⁻¹ BAP to the culture medium provides a better *in vitro* growth of embryos from coffee. Using 0.5 mg L⁻¹ NAA and 14.2 mg L⁻¹ GA₃ obtains greater shoot length of shoots of *C. arabica* L. cv. Acaiá Cerrado. It was concluded that it is possible to obtain plantlets *C. arabica* L. Acaiá Cerrado by direct somatic embryogenesis. The rooting of shoots of coffee Acaiá Cerrado occurs simultaneously with the process of acclimatization.

KEYWORDS: Somatic embryos. Coffee. Acclimatization.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. M. da C.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; PEREIRA, A. B.; CAVALCANTE-ALVES, J. M. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1063-1070, 2001.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa/CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, 1999.

- DAVIS, A. P. Six species of *Psilanthus* transferred to *Coffea* (Coffeae, Rubiaceae). **Phytotaxa**, v. 10, p. 41-45, 2010. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.10.1.6>
- DAVIS, A. P. *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. **Nordic Journal of Botany**, v. 29, p. 471-472, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.2011.01113.x>
- DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142, p. 465-512, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>
- DAVIS, A. P.; RAKOTONASOLO, F.; DEBLOCK, P. *Coffea toshii* sp. nov. (Rubiaceae) from Madagascar. **Nordic Journal of Botany**, v. 28, p. 134-136, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.2010.00710.x>
- DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 357-377, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture, part 1 – The technology. 2. ed. Edington, 1996. 1574 p.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 371-393.
- LANDEY, R. B.; CENCI, A.; GEORGET, F.; BERTRAND, B.; CAMAYO, G.; DECHAMP, E.; HERRERA, J. C.; SANTONI, S.; LASHERMES, P.; SIMPSON, J.; ETIENNE, H. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-15, 2013.
- MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; CARVALHO, C. H. S. Desenvolvimento de novas cultivares de café arábica (Ed). In: CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendação**: Brasília: Embrapa Café, 2008. v. 1, p. 79-102.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. v. 1, p. 71.
- PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P. de; PASQUAL, M. ; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta de explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, 2007.
- RIBEIRO, L. S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1479-1483, 2003.
- SHARP, W. R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.