



INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLETA DE EXPLANTES DE CAFEIEIRO NA CONTAMINAÇÃO *IN VITRO*

Mauro C. A. LOPES¹; Anna L. de R. MACIEL²

RESUMO

A embriogênese somática é um método utilizado para a propagação de plantas *in vitro*, tanto no cafeeiro quanto em outras plantas de interesse. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a época de coleta do explante foliar do cafeeiro nas porcentagens de contaminação (fúngica e bacteriana) e de oxidação fenólica *in vitro*. O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFSULDEMINAS *Campus* Muzambinho. O experimento foi conduzido no decorrer de um ano, em delineamento inteiramente casualizado, realizando 6 tratamentos com 5 repetições e 10 tubos por parcela contendo um explante foliar por tubo. O tratamento 1 foi inoculado no dia 16/08/2022, tratamento 2: dia 28/10/2022, tratamento 3: dia 21/12/2022, tratamento 4: dia 20/02/2023, tratamento 5: dia 20/04/2023. Os explantes inoculados nos meses de agosto/2022, outubro/2022 e abril/2023 não apresentam contaminações fúngicas. Não há contaminação bacteriana nos tratamentos avaliados, independente da data de inoculação. Os explantes foliares apresentam 100% de oxidação fenólica em todas as datas de inoculação.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; Embriogênese somática; Material vegetal.

1. INTRODUÇÃO

O processo de embriogênese somática indireta requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, processo dependente da ação de reguladores de crescimento, não só para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação de estado embriogênico (BOXTEL; BERTHOULY, 1996).

O explante a ser utilizado é determinante para o sucesso do processo de embriogênese somática (CARVALHO; VIDAL, 2003). Partes da planta como gemas, raízes, células isoladas, protoplastos (célula sem parede celular), semente, embriões zigóticos e anteras podem ser utilizados como início de cultivo *in vitro*, no entanto, as folhas são os explantes utilizados na embriogênese somática do cafeeiro.

Induzir a formação de calos a partir de explantes primários, é um dos primeiros passos em vários experimentos de cultura de tecidos. Os níveis de reguladores de crescimento no meio de cultura (auxina e citocinina) controlam a formação de calos (LAMEIRA et al., 2000).

¹Discente da Engenharia Agrônômica, IFSULDEMINAS – *Campus* Muzambinho. E-mail: mauro.lopes@aluno.ifsuldeminas.edu.br

²Orientadora, IFSULDEMINAS – *Campus* Muzambinho. E-mail: anna.lygia@muz.ifsuldeminas.edu.br

Rosa et al. (2006) avaliando o comportamento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate, em diferentes épocas do ano, analisou que os explantes cultivados em agosto (inverno) apresentaram a maior taxa de sobrevivência (57%) e menor contaminação por bactéria (5%) em comparação com os explantes cultivados nas mesmas condições nos outros meses do ano testado.

A oxidação é um dos problemas mais preocupantes, principalmente quando se faz o estabelecimento de cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas (TEIXEIRA, 2005).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a época de coleta dos explantes foliares de cafeeiro, inoculados ao meio de cultura secundário, e analisando as porcentagens de contaminação (fúngica e bacteriana) e de oxidação fenólica *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas, *Campus* Muzambinho, MG, no período de 23 de junho de 2022 a 22 de junho de 2023.

Foram coletados explantes foliares de *Coffea arabica* L cv. Catuaí Vermelho IAC - 144, cultivados no Laboratório de Cafeicultura do IFSULDEMINAS – *Campus* Muzambinho.

Depois da coleta, as folhas foram colocadas em um frasco com água a temperatura ambiente e encaminhada para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde foram lavadas em água corrente e detergente neutro. Posteriormente, as folhas foram imersas em álcool 70% durante 1,5 min, e assim encaminhado para a desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo durante 20 minutos. Em seguida, o material vegetal foi levado à câmara de fluxo laminar horizontal e lavado por três vezes consecutivas com água destilada esterilizada.

Os explantes foliares foram cortados em formato de quadrado com medidas próximas a 1 cm quadrado, com o auxílio de bisturi e pinça na capela de fluxo laminar. Logo, eles foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura primário, com uso de 20 uM de 2,4-D, posteriormente levados para a sala de crescimento com temperatura de 24°C e total ausência de luminosidade. Os que não apresentavam contaminação, foram cultivados em meio de cultura secundário com o uso de 10 uM de 2,4-D.

O experimento foi conduzido no decorrer de um ano, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos, cinco repetições e dez tubos por parcela contendo um explante foliar.

Os tratamentos constituíram da coleta do explante foliar em diferentes épocas do ano com um intervalo de dois meses: tratamento 1 - dia 16/08/2022, tratamento 2 - dia 28/10/2022, tratamento 3 - dia 21/12/2022, tratamento 4 – dia 20/02/2023 e o tratamento 5 - dia 20/04/2023.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), fazendo uso de metade dos sais e acrescido de vitaminas: 10mL L⁻¹, maltose: 0,4 g L⁻¹, 2,4 D: 0,04 g L⁻¹, AIB: 1 mL L⁻¹, BAB: 2 mL L⁻¹, sacarose: 40 g L⁻¹, ágar 8 g L⁻¹ e com pH foi ajustado em 5,6 +- 0,1. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1,5 atmosfera de pressão.

A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação através das porcentagens de contaminação fúngica, da porcentagem de contaminação bacteriana, da porcentagem de oxidação fenólica e da coloração do explante.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com o emprego do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo a diferença significativa entre tratamentos determinada pelo teste F e posteriormente, analisados pelo teste de comparação de médias Skott Knott.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, houve diferença estatisticamente significativa para a característica contaminação fúngica, variando entre 0 e 15%.

Tabela 1: Primeira avaliação das porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e coloração dos explantes foliares de cafeeiro coletados em diferentes épocas do ano. Muzambinho – MG. 2023.

Tratamentos	Cont. Fungo	Cont. Bactéria	Oxidação	Coloração
-----	-----%-----	-----%----	-----%----	-----
1	0,0a	0,0a	100a	Marrom
2	0,0a	0,0a	100a	Marrom
3	12,25b	0,0a	100a	Marrom
4	15,00b	0,0a	100a	Marrom
5	0,0a	0,0a	100a	Marrom
CV (%)	53,33	-	-	-

(*) Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste Scott Knott ao nível de 0,05 de significância.

Os explantes que foram inoculados nas datas 16/08/2022, 28/10/2022 e 20/04/2023, respectivamente os tratamentos 1, 2 e 5 não foram contaminados por fungos (Tabela 1).

De acordo com a Tabela 1 não houve contaminação bacteriana nos tratamentos analisados.

A presença de microrganismos endofíticos em tecidos vegetais têm sido verificados em relação a um grande número de espécies de plantas (PEREIRA et al., 2003). Embora seus efeitos sejam pouco conhecidos, sob condições *in vitro*, a presença destes microrganismos, tanto fungos como bactérias, constituem-se numa das mais importantes causas de perda de material vegetal.

Para todas as datas de inoculação dos explantes houve 100% de oxidação fenólica, promovendo uma coloração marrom nos explantes (Tabela 1).

Um problema frequentemente encontrado no cultivo *in vitro* é o escurecimento dos tecidos lesados do explante causado pela oxidação de compostos fenólicos, o que prejudica o crescimento dos explantes (UTINO et al., 2001). Resultados parcialmente semelhantes foram observados no presente trabalho, onde houve 100% de oxidação fenólica. No entanto, existem ainda fatores internos e externos que controlam a produção dos compostos fenólicos, como hormônios, luz e nutrientes.

5. CONCLUSÃO

Os explantes inoculados nos meses de agosto/2022, outubro/2022 e abril/2023 não apresentam contaminações fúngicas. Não há contaminação bacteriana nos tratamentos avaliados, independente da data de coleta e inoculação ao meio secundário.

Os explantes foliares apresentam 100% de oxidação fenólica em todas as datas de inoculação ao meio secundário independente da época de coleta.

REFERÊNCIAS

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 19-25, 2010.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. **Embrapa**, Campina Grande, Pb, v. 116, n. 41, p. 01-41, out. 2003.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, E. B. P. **Cultura de tecido (manual)**. Belém, Pa: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473- 479, June 1962.

ROSA, F. C.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; QUADROS, K. M. Micropropagação de erva mate: Efeito de diferentes épocas do ano no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. Colombo, Pr: **Embrapa**, 2006.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, [s.d]. 2005.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (Musa AAB) *in vitro*. iv. concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 409-412, ago. 2001.