



OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA SEMENTES ARTIFICIAIS DE *Coffea arabica*

Mauro C. A. LOPES¹; Lawany C. C. SILVA²; Raquel B. CRUZ³; Jaqueline R. PAULA⁴; Eduarda S. TRINDADE⁵; Anna L. R. MACIEL⁶.

RESUMO

As sementes artificiais ou sintética têm sido usadas para propagação de diferentes espécies, porém a secagem rápida das cápsulas é um dos maiores problemas enfrentados. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a porcentagem de contaminação, de oxidação e de germinação em embriões de cafeeiro para otimização de protocolo de sementes artificiais. O experimento foi desenvolvido no IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4 totalizando 20 parcelas e cinco embriões por parcela. Para o cultivo *in vitro*, foram utilizados embriões zigótico de *Coffea arabica* L. cv Paraíso. Os tratamentos foram T1 sem proteção; T2 proteção com cera de coco em formato quadrado; T3 proteção com cera de coco + manteiga, em formato quadrado; T4 proteção com cera de coco; T5 proteção com cera de coco + manteiga. Foi avaliado as porcentagens de contaminação, de oxidação e de germinação dos embriões zigóticos, onde o tratamento T1 foi o mais eficiente dentre as avaliações.

Palavras-chave: Micropropagação; Biotecnologia; Cultivo *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

A introdução de técnicas biotecnológicas para auxiliar nos programas de melhoramento genético do cafeeiro é cada vez mais frequente, sendo a embriogênese somática um importante método de propagação *in vitro*, que consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, sem que haja fusão de gametas, reduzindo assim a distância e facilitando a acessibilidade de materiais com características agronômicas superiores (CARVALHO et al., 2013).

A produção de sementes artificiais formadas a partir do encapsulamento de embriões somáticos envoltos em tegumentos artificiais que são compostos por uma camada gelificante e resultam em sementes análogas às sementes naturais é uma das técnicas com grande potencial de aplicação (BASKARAN; KUMARI; VAN STADEN, 2015).

O objetivo do trabalho foi avaliar as porcentagens de contaminação, de oxidação e de germinação de embriões zigóticos no processo de otimização de protocolo de sementes artificiais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A embriogênese somática do cafeeiro pode ser realizada utilizando-se duas rotas de desenvolvimento: direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente dos tecidos matrizes

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

² Discente da Engenharia Agrônoma, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: lawany.silva@alunos.ifsuldeminas.edu.br

³ Discente da Engenharia Agrônoma, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: raquelescola12345@gmail.com

⁴ Tecnóloga em cafeicultura, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: jaqueline.paula@aluno.ifsuldeminas.edu.br

⁵ Discente da Engenharia Agrônoma, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: eduardatrindade.agronomia@gmail.com

⁶ Orientadora, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: anna.lygia@muz.ifsuldeminas.edu.br

sem a formação de calos; e indireta, na qual os embriões somáticos formam-se a partir de calos, uma massa de células com crescimento desordenado. A metodologia de embriogênese somática indireta na espécie é a mais promissora, no entanto, ainda precisa ser otimizada e adaptada para a realidade encontrada na produção em larga escala (DONATO; CARDOSO; CARDOSO, 2000).

O conceito de semente sintética é definido originalmente pelo encapsulamento de maneira artificial de embriões somáticos em matrizes gelificantes para servirem como sementes sintéticas aptas à semeadura (MURASHIGE, 1978).

Em soluções de alginato de sódio, os explantes ou embriões selecionados na cultura de tecido são misturados e passam por uma etapa de complexação para a realização do encapsulamento, onde gotículas de alginato com explantes individuais são liberadas em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2). As capsulas são formadas após essas gotículas permanecerem embebidas em solução salina por 20 a 30 minutos, denominado semente sintéticas (MAHFELI et al., 2022).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado do IFSULDEMINAS, *Campus* Muzambinho, MG, de abril a maio de 2024. Para o cultivo *in vitro*, os embriões foram extraídos de frutos colhidos em estágio de maturação verde-cana, em lavoura de *Coffea arabica* L. cv Paraiso.

Os frutos foram desinfestados com álcool 70% por 1,5 minutos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo durante 20 minutos. Os embriões foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na concentração de 50% dos sais por um período de 24 horas.

As sementes artificiais foram confeccionadas com o uso do meio MS na concentração de 50% dos sais com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, posteriormente foram autoclavadas por um período de 20 minutos sob temperatura de 120°C e 1,5 atmosfera de pressão. Na capela de fluxo laminar o meio foi acrescido de 3g L^{-1} de alginato de sódio e 1g L^{-1} de goma xantana.

Os embriões foram submersos na matriz de encapsulamento e resgatados com auxílio de uma pipeta automática ajustada para $500\ \mu\text{L}$, sendo então, gotejados em solução de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a concentração de 100mM, onde permaneceram por 20 minutos para sua complexação. Após este período, as sementes foram submetidas em solução de nitrato de potássio (KNO_3) na concentração de 100mM, por 20 minutos, para em seguida, serem submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×4 com 20 parcelas e cinco embriões por parcela. Os tratamentos constituíram-se por diferentes métodos de proteção da semente artificial, sendo o T1: sem; T2: cera de coco; T3: uso 50% cera de coco + 50%

de manteiga, T4: cera de coco (emergindo a casulo de alginato de sódio em cera); T5: uso 50% cera de coco + 50% de manteiga (emergindo a casulo de alginato de sódio em cera).

Foram realizadas duas avaliações, a primeira aos onze dias e a segunda aos vinte e nove dias após a inoculação. Verificou-se as porcentagens de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana de oxidação fenólica e de germinação.

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, analisados pelo teste de comparação de médias Skott e Knott (1974).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, houve diferença significativa na primeira avaliação para as porcentagens de contaminação fúngica e de germinação. As menores porcentagens de contaminação fúngica foram observadas nos tratamentos T1, T4 e T5, valores estes considerados baixos (Tabela 1).

Tabela 1: Primeira avaliação das porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e germinação das sementes artificiais em diferentes tratamentos de otimização de protocolo de sementes artificiais. Muzambinho – MG. 2024.

Tratamento	Fungo	Bactéria	Oxidação	Germinação
-----	---%---	---%---	---%---	---%---
1	0,00 a	10,00 a	8,75 a	35,00 a
2	20,00 b	0,00 a	0,00 a	0,00 b
3	35,00 b	5,00 a	23,75 a	5,00 b
4	0,00 a	0,00 a	20,00 a	0,00 b
5	5,00 b	0,00 a	5,00 a	0,00 b
CV (%)	128,20	344,27	132,17	142,52

(*) Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste Scott Knott (1974) ao nível de 0,05 de significância.

Na Tabela 2, observou-se diferença significava para as porcentagens de contaminação fúngica, de contaminação bacteriana, de oxidação e de germinação. Os tratamentos T1, T4 e T5 apresentaram menor porcentagem de contaminação fúngica, com valores de 5%, 5% e 10%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Segunda avaliação das porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e germinação das sementes artificiais em diferentes tratamentos de otimização de protocolo de sementes artificiais. Muzambinho – MG. 2024.

Tratamento	Fungo	Bactéria	Oxidação	Germinação
-----	---%---	---%---	---%---	---%---
1	5,00 a	20,00 b	12,50 a	80,00 a
2	40,00 b	0,00 a	92,50 b	5,00 b
3	75,00 c	15,00 b	80,00 b	5,00 b
4	5,00 a	0,00 a	92,50 b	0,00 b
5	10,00 a	10,00 b	85,00 b	0,00 b
CV (%)	56,98	107,34	15,00	50,72

(*) Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste Scott Knott (1974) ao nível de 0,05 de significância.

Os tratamentos T2 e T4 não apresentaram contaminação bacteriana (Tabela 2). Para as

porcentagens de oxidação e germinação, o tratamento T1 sem o uso de proteção da capsula foi o que apresentou melhor resultado, como mostra a Tabela 2.

O desenvolvimento de endosperma sintético para o encapsulamento pode ser um dos principais problemas que está ligado a demora para o desenvolvimento da tecnologia de sementes sintéticas, para ser semelhantes as sementes naturais vigorosas, nas sementes artificiais ainda não foi encontrado as características físicas e químicas ideais para promover uma boa germinação (SILVA, 2023).

5. CONCLUSÃO

Na primeira avaliação, as menores porcentagens de contaminação fúngica são observadas nos tratamentos T1, T4 e T5 e o T1 apresenta maior porcentagem de germinação.

Na segunda avaliação, os tratamentos T1, T4 e T5 apresentam menor porcentagem de contaminação fúngica. T2 e T4 não apresentaram contaminação bacteriana. O tratamento T1 apresenta menores porcentagens de oxidação e maior porcentagem de germinação dos embriões de cafeeiro.

REFERÊNCIAS

BASKARAN, P.; KUMARI, A.; VAN STADEN, J. Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 121, n. 1, p. 205-214, 2015.

CARVALHO, C.H.S.; PAIVA, A. C. R. dos S.; SILVA, E. Q.; CUSTÓDIO, A. A. Custo de Produção de Mudanças Clonais de Café Arábica Produzidas por Embriogênese Somática. **Embrapa**, Brasília. Df, v. 3, n. 10, p. 01-10, abr. 2013.

DONATO, M.L.S.; CARDOSO, J.L.; CARDOSO, J.C. Indução de embriogênese somática em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Ciência Rural**, 2000.

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

MAHFELI, M.; MINAEI, S.; FADAVI, A.; DAYLAMI, S. D. Precision measurement of physical properties of orchid synthetic seeds produced under various encapsulation conditions using Image J platform. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 187, p. 115-364, nov. 2022.

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.

MURASHIGE, T. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: **Thorpe, T. (Ed.), Frontiers of Plant Tissue Cultures**. International Association for Plant Tissue Culture, University of Calgary, Alberta, Canada, 1978. p. 15–26.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SILVA, L. F. da. **PROPAGAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR: Métodos e perspectivas**. 25f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Agronomia, Instituto Federal Goiano, Ceres – Go, 2023.