

## DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE CAFÉ ARÁBICA (*Coffea arabica* L.) PARA ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

**Giovanna CERQUEIRA<sup>1</sup>; Anna Lygia de R. MACIEL<sup>1</sup>; Jéssica B. AZEVEDO<sup>1</sup>;  
Renata A. MOREIRA<sup>1</sup>; Felipe Campos FIGUEIREDO<sup>1</sup>**

### RESUMO

A micropropagação possui grande aplicação na cultura do cafeeiro, no qual o sucesso da desinfestação do material vegetal consiste em um dos principais entraves para o estabelecimento *in vitro*. A alta taxa de contaminação e oxidação dos explantes inoculados no meio de cultura tem dificultado o cultivo *in vitro* de *Coffea arabica*. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo eficiente, que reduza o índice de contaminação para a utilização posterior em estudos de calogênese e embriogênese somática. Foram desenvolvidos ensaios experimentais com explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Rubi, submetidos a diferentes tratamentos de assepsia. As folhas foram lavadas com água e detergente neutro, imersas em solução de Fegatex®, na concentração 5ml L<sup>-1</sup> de água, nos períodos de 5, 10, 15 e 20 minutos, constituindo 4 tratamentos, depois, imersas em solução de hipoclorito de sódio (1,25%) por 20 minutos, seguidos de tríplice lavagem. Excisados e inoculados em meio MS, que teve o pH ajustado para 5,7 e autoclavado a 121°C, à 1,5 atm, por 20 min. Os tubos com os explantes permaneceram em BOD sob fotoperíodo de 16h/8h e temperatura de 25°C. Após trinta dias do estabelecimento foram avaliados a porcentagem oxidação e de contaminação. O tratamento que obteve maior êxito foi a utilização do Fegatex® (5ml L<sup>-1</sup> água) por 15 minutos em imersão, e o uso do hipoclorito de sódio (1,25%) por 20 minutos de imersão, tornando-se agentes eficientes no controle de fungos e bactérias em explantes.

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho. Muzambinho/MG, email: [giovannacerq@hotmail.com](mailto:giovannacerq@hotmail.com); [anna.lygia@muz.ifsuldeminas.edu.br](mailto:anna.lygia@muz.ifsuldeminas.edu.br); [jessikbio@hotmail.com](mailto:jessikbio@hotmail.com); [renata\\_amato@hotmail.com](mailto:renata_amato@hotmail.com); [felipe.professor@yahoo.com.br](mailto:felipe.professor@yahoo.com.br).

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e o exportador mundial de café, responsável por 30% do mercado internacional onde as áreas cafeeiras se destacam no Centro-Sul do país, na qual a produção de café arábica (*Coffea arabica* L.) predomina nas lavouras em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo (ABIC, 2014).

A cultura de tecidos vegetais possui grande aplicação prática na agricultura visando o melhoramento genético e a clonagem para produção em larga escala de mudas sadias. O sistema de propagação de espécies como o cafeeiro requer a formação de mudas de boa qualidade a partir de linhagens produtivas, bem adaptadas, sadias e vigorosas. Sendo assim, o uso de técnicas de cultura de tecidos tem se apresentado como alternativa para obtenção de mudas de cafeeiros, as quais possibilitam a multiplicação de grande número de plantas com uniformidade genética, em curto espaço de tempo ao longo de todo o ano (FIGUEIREDO, 2011).

Na micropropagação de uma espécie, o primeiro passo é o seu estabelecimento *in vitro*. No entanto, um dos maiores entraves no seu estabelecimento está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação por bactérias e fungos. Mesmo após a realização da desinfestação dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena permanecem no material (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o estabelecimento *in vitro* de material vegetal de *Coffea arabica* L. cv. Rubi utilizando-se ensaios de assepsia de tecido foliar, visando à elaboração de um protocolo que reduza o índice de contaminação para a utilização posterior em estudos de calogênese e embriogênese somática.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no período de Julho a Agosto de 2014, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas – Campus Muzambinho, em Muzambinho – MG.

Para a instalação do experimento foram utilizadas como explantes primários folhas jovens de ramo plagiotrópicos do terço médio de *Coffea*

*arabica L. cv. Rubi*. Após a coleta, as folhas foram cuidadosamente lavadas com água e detergente neutro.

O meio nutritivo semissólido utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e solidificado com 0,6% de ágar. Através do pHmetro, foi feito o ajuste do pH para 5,7 antes da autoclavagem para a esterilização do meio de cultura, das vidrarias e de outros materiais que são utilizados para a inoculação do explante. A temperatura da autoclave utilizada foi de 121°C, à 1,5 atm, por 20 minutos.

Para a inoculação de explantes foram utilizadas câmaras de fluxo laminar sob condições de plena assepsia com uso de etanol a 70% (v/v). As folhas foram imersas em substância constituída de cloretos de etilbenzalcônios e cloretos de benzalcônios, Fegatex®, com ação fungicida, esporicida e bactericida, na concentração 5ml L<sup>-1</sup> de água, nos períodos de 5, 10, 15 e 20 minutos e depois, feita uma tríplice lavagem com água destilada. Em seguida, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio na concentração 1,25% (v/v) por 20 minutos, seguido de uma nova tríplice lavagem.

Após estes procedimentos, foi feita a eliminação da nervura central e das extremidades laterais e apicais das folhas, e os explantes foram excisados em tamanhos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente. Posteriormente inoculadas com o lado abaxial voltado para a superfície do meio nutritivo, contido em tubos de ensaio (150x25mm) com 15 ml de meio cada. O material inoculado foi mantido em câmara tipo BOD, sob fotoperíodo de 16h/8h e temperatura de 25°C.

O delineamento experimental utilizado no trabalho foi inteiramente ao acaso, sendo este constituído por 4 tratamentos, com 5 repetições e 10 tubos por repetição. As avaliações foram realizadas aos 30 dias após o estabelecimento dos explantes. Os aspectos avaliados foram: a porcentagem de contaminação e a de explantes necrosados e oxidados. 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. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de regressão polinomial.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os tratamentos utilizando Fegatex® em diferentes períodos de imersão associados ao hipoclorito de sódio (NaClO) para assepsia dos explantes apresentaram diferenças para as avaliações realizadas trinta dias após o estabelecimento do trabalho.

Observa-se que, não houve diferença entre os tratamentos 1 e 4, visto que ambos apresentam as maiores porcentagens de contaminação dos explantes foliares. Já em relação aos tratamentos 2 e 3, eles diferiram entre si, conferindo um menor índice de contaminação no tratamento 3 com 6% de contaminação (Figura 1).

Para Medeiros (1999), os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo.

Segundo Leifert *et al.* (1991), a condição fitossanitária da planta determina a eficiência no processo de desinfestação dos explantes.

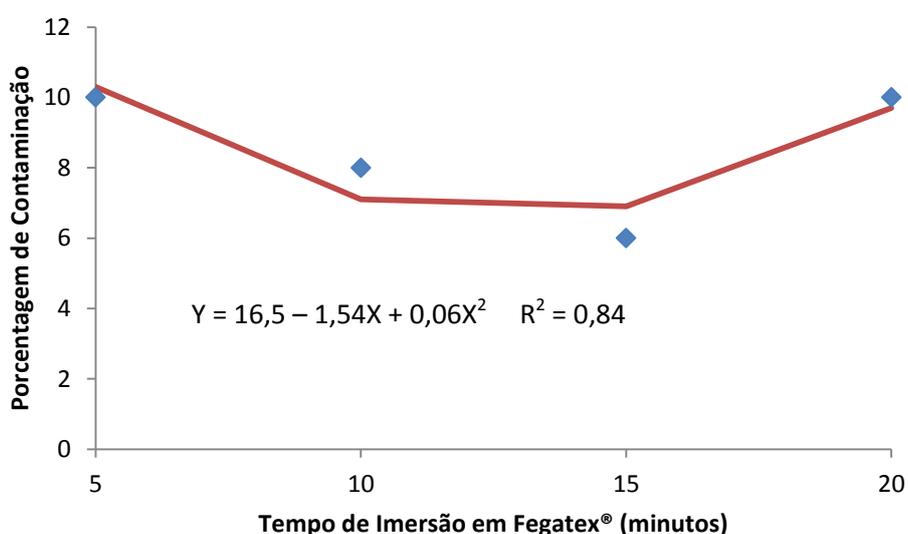


Figura 1: Porcentagem de contaminação em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Rubi desinfestados em diferentes períodos de imersão em solução do fungicida Fegatex®. IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. 2014.

Verifica-se que a menor porcentagem de oxidação dos explantes foi observada quando se utilizou o fungicida Fegatex® por quinze minutos (Figura 2).

Modgil et al. (1999) relatam que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, e segundo Grattapaglia e Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina.

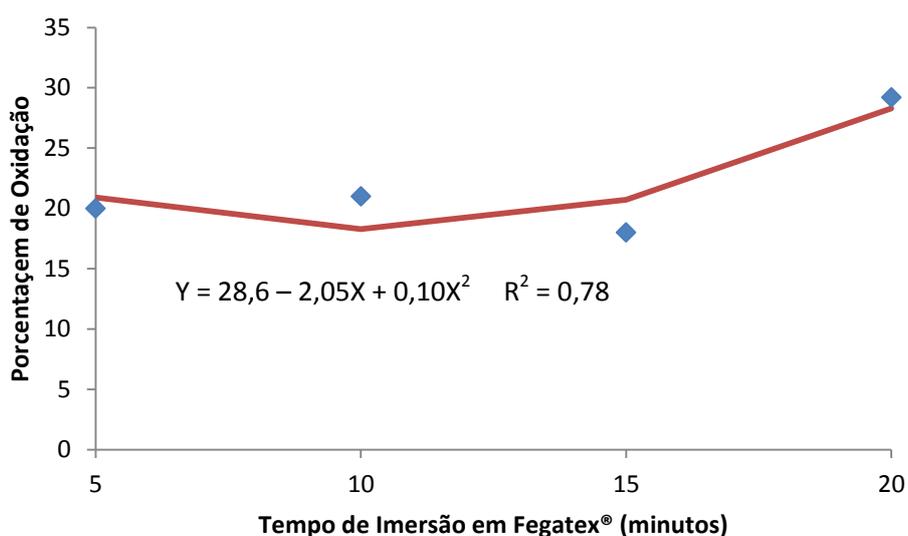


Figura 2: Porcentagem de oxidação em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Rubi desinfestados em diferentes períodos de imersão com solução do fungicida Fegatex®. IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. 2014.

Os melhores resultados foram obtidos com o tratamento 3, havendo baixo índice de contaminação (6%) e de oxidação (18%) em detrimento dos outros tratamentos e a outros experimentos montados utilizando outros métodos. Entretanto, ajustes devem ser realizados, bem como a possibilidade de utilizar agentes antioxidantes ao protocolo, com o objetivo de reduzir os problemas com perdas devido às oxidações dos explantes de cafeeiros.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que: explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Rubi imersos em fungicida, bactericida e esporicida Fegatex® (5ml L<sup>-1</sup> de água) por um período

de quinze minutos é eficiente na assepsia do material vegetal, reduzindo as porcentagens de contaminação e oxidação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC) **A história do café** - origem e trajetória. 2011. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>. Acesso em 07 de ago. 2014.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p.183-260, 1998.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**. Vol.35, no. 6. Lavras. Nov./Dec.2011.

FIGUEIREDO, S. A. **Caracterização bioquímica e molecular da  $\beta$ -galactosidase durante a maturação de frutos de *Coffea arabica***. 2011. 244 p. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

LEIFERT, C., RITCHIE, J. Y., WAITES, W. M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-469, 1991.

MEDEIROS, C.P.C. **Indução in vitro de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 1999. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.