



AValiação de diferentes concentrações de meio de cultura MS e de ácido giberélico na complexação de sementes artificiais de cafeeiro

Mauro César Araújo Lopes¹
Maysa Arede de Almeida Araújo²
João Victor de Santana Sanches³
Anna Lygia de Rezende Maciel⁴
Generci Dias Lopes⁵
Claudimir da Silva Santos⁶

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e porcentagem de germinação no estabelecimento de sementes artificiais com embriões zigóticos de cafeeiro em diferentes concentrações de meio MS e ácido giberélico. O presente experimento foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no IFSULDEMINAS Campus Muzambinho. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x6 com 36 parcelas e quatro embriões por parcela, os tratamentos foram, T1: 0% do meio MS e 5 mg L⁻¹ de GA₃; T2: 25% de MS e 5 mg L⁻¹ de GA₃; T3: 50% de MS e 5 mg L⁻¹ de GA₃; T4: 0% do meio MS e 10 mg L⁻¹ de GA₃; T5: 25% de MS e 10 mg L⁻¹ de GA₃; T6: 50% de MS e 10 mg L⁻¹ de GA₃. Foram realizadas duas avaliações, a primeira com seis dias e a segunda aos vinte e sete dias após a inoculação. O tratamento 2 obteve 91,66% de germinação, o tratamento 6 apresentou 8,33 % de contaminação fúngica e o tratamento 5 foi o mais eficiente para o controle contaminação bacteriana.

Palavras-chave: Embriogênese Somática; Micropropagação; *Coffea arabica* L.

¹ Discente: Graduando em Engenharia Agrônoma. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho, maurolopes118@gmail.com

² Graduado: Graduada em Engenharia Agrônoma. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho, maysaarede@gmail.com

³ Discente: Graduando em Engenharia Agrônoma. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho, joaovictordesantanasanches@gmail.com

⁴ Orientador (a); Prof^a. Dr^a. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho, IFSULDEMINAS, anna.lygia@muz.ifsuldeminas.edu.br

⁵ Servidor: Técnico administrativo. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho, Generci.Lopes@muz.ifsuldeminas.edu.br

⁶ Professor; Prof. Dr. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho, IFSULDEMINAS, Claudimirsilvasantos@gmail.com



INTRODUÇÃO

Historicamente a propagação de plantas de cafeeiro da espécie *Coffea arabica* L., foi realizada por meio de sementes, método esse consagrado como ideal para a cultura até então. Porém, o longo período necessário para obtenção de uma cultivar no processo de melhoramento genético é um problema com o uso desse método. A propagação vegetativa como estaquia e embriogênese somática obtém-se clones de híbridos com grande potencial produtivo, surgindo como alternativa para o desenvolvimento de novas cultivares, em menor tempo (DOMINGHETTI et al., 2016)

Em cafeeiro, a embriogênese somática pode ocorrer por duas vias diferentes: direta e indireta. Na indireta, os embriões originam-se diretamente dos explantes a partir de um processo de rediferenciação celular (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002). Na direta, a partir do explante, origina-se um aglomerado de células desdiferenciadas, de coloração amarela característica, denominadas calos embriogênicos, que se multiplicam até serem estimuladas a se rediferenciar em embriões somáticos (SANTANA-BUZZY et al., 2007)

Vários trabalhos de cultura de tecidos com diferentes objetivos têm sido realizados na cultura do cafeeiro. Porém, devido principalmente a contaminações, oxidação, baixa ou nula regeneração e problemas na aclimatização de plantas, a eficiência da técnica apresenta limitações, (LONDOÑO; OROZCO, 1986).

O cultivo *in vitro* de embriões oferece sistema controlado para estudar os problemas fisiológicos, nutricionais e bioquímicos dos embriões em vários estádios de desenvolvimento (PASQUAL; PINTO, 1988). As duas considerações mais importantes na cultura de embriões do ponto de vista técnico, são a composição do meio de cultura e a excisão do embrião, com a composição do meio e a preparação asséptica dos embriões variando entre as espécies (ANDREOLI, 1985).

A transferência das mudas produzidas *in vitro*, para o ambiente natural, ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado é denominado de aclimatização, é conceituada como sendo uma das fases da micropropagação, (DEBERGH E MAENE, 1981). Para obtenção de mudas de qualidade obtidas por cultura de tecidos, esse é um processo crucial.

Tendo em vista sua eficácia e potencial de redução de custos a tecnologia de sementes sintéticas



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

surgiu como uma ferramenta promissora na micropropagação de plantas, (Pattnaik & Chand, 2000).

A técnica de produção de sementes artificiais e encapsulamento inicia-se com a indução do embrião somático em meio de cultura ou germinação in vitro de sementes convencionais para posterior encapsulamento dos protocormos gerados. Em seguida, utilizando um material gelificante que somado a outros componentes constitui a matriz de encapsulamento, os embriões são encapsulados individualmente (VARGAS et al., 2014). Essas sementes artificiais são armazenadas a curto ou médio prazo em condições específicas para cada espécie ou gênero, a depender da aplicação, e posteriormente, são convertidas em plântula novamente (HAQUE; GHOSH, 2017).

A cápsula que envolve o explante realiza o papel do endosperma de uma semente natural, regulando o crescimento e propiciando nutrição, como também, confere proteção contra danos mecânicos feito o tegumento, mas de modo artificial (MALABADI; STADEN, 2005).

Para encontrar o que melhor se enquadra a necessidade do vegetal, permitindo sua sobrevivência muitos materiais em gel já foram testados, em relação à composição da matriz de encapsulamento. Entretanto, segundo Rihan et al. (2017) devido à sua espessura sensível, fraca capacidade de fiação da solução, baixo custo, características de bioadequação e rápida gelificação, a matriz composta por alginato se destacou.

O objetivo desse trabalho foi avaliar as porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e porcentagem de germinação no estabelecimento de sementes artificiais com embriões zigóticos de cafeeiro em diferentes concentrações de meio MS e ácido giberélico.

METODOLOGIA

O presente experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais localizado no prédio de Ciências Agrárias e Biológicas I do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Muzambinho, no município de Muzambinho, Minas Gerais, no mês de maio de 2024. Para a produção das sementes artificiais, foram utilizados embriões zigóticos de *Coffea arabica* L. da cultivar Paraíso extraídos de frutos em estágio verde cana em câmara de fluxo laminar.

Os frutos foram desinfestados com álcool 70% por 1,5 minutos e posteriormente em solução de



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

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. Após este período, os embriões foram submetidos a matriz de encapsulamento para complexação e formação das sementes artificiais referentes a cada tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x6 com 36 parcelas e quatro embriões por parcela. Os tratamentos foram realizados com diferentes concentrações de meio de cultura (MS) e diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) para a confecção das sementes artificiais. Onde, os tratamentos foram, T1: 0% do meio MS e 5 mg L⁻¹ de GA₃; T2: 25% de MS e 5 mg L⁻¹ de GA₃; T3: 50% de MS e 5 mg L⁻¹ de GA₃; T4: 0% do meio MS e 10 mg L⁻¹ de GA₃; T5: 25% de MS e 10 mg L⁻¹ de GA₃; T6: 50% de MS e 10 mg L⁻¹ de GA₃.

Todos os meios de cultura confeccionados para a complexação das sementes artificiais em cada tratamentos mencionados, foi realizado com pH ajustado para 5,7±0,1 e autoclavado 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 µL, sendo então, gotejados em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O) 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 (KNO₃) na concentração de 100mM, por 20 minutos, para em seguida, serem submetidas a tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Logo após as sementes artificiais serem complexadas, elas foram inoculadas em tubos de ensaios com meio de cultura MS na concentração de 100% dos sais, em seguidas os tubos foram levados para a sala de crescimento que permaneceu até serem avaliadas.

Foram realizadas duas avaliações, a primeira com seis dias e a segunda aos vinte e sete 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 Knott.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação não foi observado diferença significativa para os tratamentos em porcentagens de contaminação fúngica e porcentagens de oxidação fenólica. Para as porcentagens de contaminação bacteriana e porcentagens de germinação houve diferença significativa. Como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Primeira avaliação das porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e germinação das sementes artificiais em diferentes tratamentos para estabelecimento *in vitro*. Muzambinho – MG. 2024.

Tratamento	Fungo ---%---	Bactéria ---%---	Oxidação ---%---	Germinação ---%---
1	8,33 a	0,00 a	0,00 a	41,66 a
2	4,16 a	16,66 a	0,00 a	29,16 a
3	8,33 a	87,50 c	0,00 a	4,16 b
4	16,66 a	70,83 b	0,00 a	41,66 a
5	25,00 a	0,00 a	0,00 a	20,83 b
6	0,00 a	0,00 a	0,00 a	37,50 a
CV (%)	172,51	47,47	0,00	73,40

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

Na porcentagem de contaminação fúngica, apesar de não haver diferença significativa, os tratamentos T6 e T2 se destacaram com resultado de 0,00% e 4,16%, respectivamente. Para a contaminação bacteriana, os tratamentos T1, T5 e T6 apresentaram as menores porcentagens. O tratamento T3 foi o que apresentou maior porcentagem de contaminação bacteriana na primeira avaliação (Tabela 1).

Na Tabela 1, as maiores porcentagens de germinação foram observadas nos tratamentos T1, T2, T4, e T6.

Na segunda avaliação, pôde ser observado que não houve diferença significativa para as porcentagens de contaminação fúngica. Já para as porcentagens de contaminação bacteriana, de oxidação fenólica e de germinação, houve diferença significativa (Tabela 2).



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

Tabela 2: Segunda avaliação das porcentagens de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação fenólica e germinação das sementes artificiais em diferentes tratamentos para estabelecimento *in vitro*. Muzambinho – MG. 2024.

Tratamento	Fungo	Bactéria	Oxidação	Germinação
-----	---%---	---%---	---%---	---%---
1	12,50 a	12,50 a	2,08 a	83,33 a
2	12,50 a	83,33 b	0,00 a	91,66 a
3	16,66 a	95,83 b	16,66 b	37,50 b
4	25,00 a	83,33 b	12,50 b	54,16 b
5	25,00 a	8,33 a	0,00 a	66,66 b
6	8,33 a	62,50 b	2,08 a	66,66 b
CV (%)	122,47	41,33	128,82	37,50

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

Na porcentagem de contaminação fúngica, mesmo não havendo diferença significativa na segunda avaliação, o T6 foi o que apresentou menor porcentagem. Para a porcentagem de contaminação bacteriana os tratamentos T5 e T1 apresentaram menores valores, 8,33 e 12,50%, respectivamente (Tabela 2).

Os tratamentos T2 e T5 não apresentaram oxidação fenólica dos explantes. Já para os tratamentos T6 e T1, a porcentagem de oxidação fenólica, pode ser considerada muito baixa com valores de 2,08 % (Tabela 2).

Para a porcentagem de germinação, os tratamentos T1 e T2 apresentaram os maiores valores, 83,33% e 91,66%, respectivamente (Tabela 2).

Piza, Silva e Maciel (2017), avaliando a influência de diferentes concentrações dos sais do meio de cultura MS e de goma xantana para otimização de um protocolo para produção de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de *Coffea arabica* L., observaram que os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 25 e 50% dos sais do meio MS e goma xantana nas concentrações de 0, 1, 1,5 e 2%, diferente dos resultados encontrados nesse trabalho.



CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira e na segunda avaliações, os tratamentos T1, T2, T5 e T6 apresentaram as menores porcentagens de oxidação fenólica. As maiores porcentagens de germinação das sementes artificiais, na primeira avaliação, foram nos tratamentos T1, T2, T4 e T6.

Na segunda avaliação, as menores porcentagem de contaminação bacteriana e as maiores porcentagens de germinação das sementes artificiais foram nos tratamentos T1 e T2.

A tecnologia de produção de sementes artificiais necessita de aprimoramentos contínuos, sendo assim, pesquisas devem ser desenvolvidas para a reconstituição do endosperma sintético a fim de aprimoramento desta tecnologia de modo a promover a semeadura direta em condições de viveiro com alto índice de germinação e desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grupo de estudo Gplant *in vitro*, ao IFSULDEMINAS e a minha orientadora.

REFERÊNCIAS

ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28.

DOMINGHETTI, A. W.; SOUZA, A. J. de J.; SILVEIRA, H. R. de O.; SANTANA, J. A. do V.; SOUZA, K. R. D. de.; GUIMARÃES, R. J.; LACERDA, J. R. Tolerância ao déficit hídrico de cafeeiros produzidos por estaquia e embriogênese somática. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 1, p. 117-126, julho, 2016.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A Scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 14, p. 335-345, Apr. 1981.

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



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

GRAY, D.J.; PUROHIT, A. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.10, p.33–61, 1991.

HAQUE, S. M.; GHOSH, B. Regeneration of cytologically stable plants through dedifferentiation, redifferentiation, and artificial seeds in *Spathoglottis plicata* Blume. (Orchidaceae). **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 5, p. 199-208, 2017.

LONDOÑO, L.; OROZCO, F. Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo in vitro. **Cenicafé**, Manizales, v. 37, n. 4, p. 119-133, oct./dic.1986.

MALABADI, R. B.; STADEN, J. V. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 82, n. 3, p. 259-265, 2005.

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.

NIEVES, N.; LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ, J.; PERALTA, H.; HERNÁNDEZ, M.; SANTOS, R.; CONCEPCIÓN, O.; BORROTO, C.G.; BORROTO, E.; TAPIA, R.; MARTINEZ, M.E.; FUNDORA, Z.; GONZÁLEZ, A. Artificial endosperm of *Cleopatra* tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, p.77–83, 1998.

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p. 137–145, 1994.

PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Cultura de embriões. **Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, v. 9, p. 2-12, 1988.

PATTNAIK, S.; CHAND, P.K. Morphogenic responses of the alginate-encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.177-185, 2000.

PIZA, M. R.; SILVA, P. R. da.; MACIEL, A. L. de R. Otimização de um protocolo para produção de sementes sintéticas a partir de embriões de cafeeiro. In: 9º JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO IFSULDEMINAS E 6º SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2017. Machado. **Anais...** Machado: IFSULDEMINAS, 2017. v. 9. p. 1- 4.

QUIROZ-FIGUEROA, F. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 12, p. 1141-1149, 2002.



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

RIHAN, H. Z.; KAREEM, F.; EL-MAHROUK, M. E.; FULLER, M. P. Artificial seeds (principle, aspects and applications). **Agronomy**, v. 7, n. 4, p. 71, 2017.

SANTANA-BUZZY, N. ET AL. ADVANCES IN COFFEE TISSUE CULTURE AND ITS PRACTICAL APPLICATIONS. **IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT**, v. 43, N. 6, P. 507-520, DEC 2007.

VARGAS, D.; DUTRA, L.; FORMOSO, R.; COSTA, R. R.; CORADIN, J.; TAVARES, V. D. S.; CASTRO, C. SEMENTES SINTÉTICAS: TECNOLOGIA PARA VIABILIZAR A CONSERVAÇÃO IN VITRO DA BATATA. **EMBRAPA CLIMA TEMPERADO-ARTIGO EM PERIÓDICO INDEXADO (ALICE)**, 2014.

REALIZAÇÃO

