

## CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CAFÉ UTILIZANDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO BÓRICO <sup>1</sup>

Cristiane Carvalho Pereira<sup>2</sup>, Ana Cristina de Souza<sup>3</sup>, Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa<sup>4</sup>, Tatiana Botelho Fantazzini<sup>5</sup>, Ricardo Stéfano Filho<sup>6</sup>, Marcela Andreotti Ricaldoni<sup>7</sup>, Madeleine Alves de Figueiredo<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Trabalho Financiado por pelo Consórcio Pesquisa Café, INCT e Embrapa Café

<sup>2</sup> Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, cristianecpe@gmail.com

<sup>3</sup> Pesquisadora, Dra, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, acstina@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Pesquisadora, Dra, Embrapa Café, Brasília - DF, sttela.rosa@embrapa.br

<sup>5</sup> Pesquisadora, Dra, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, tatiana\_botelho@hotmail.com

<sup>6</sup> Bolsista, Iniciação científica, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, ricardodestefano@hotmail.com

<sup>7</sup> Doutoranda, Dra, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, marcela\_ricaldoni@hotmail.com

<sup>8</sup> Pesquisadora, Dra, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, madeleineafigueiredo@gmail.com

**RESUMO:** Sementes de café são armazenadas por um curto período de tempo, devido à sua rápida perda da qualidade, o que dificulta a obtenção de mudas com desejável padrão de qualidade, no momento ideal ao plantio. Em pesquisas recentes, tem sido confirmado que o endosperma das sementes de café é mais sensível ao processo de deterioração do que o embrião, sendo que este pode germinar e formar uma plântula normal quando isolado de uma semente deteriorada. O uso de antioxidantes pode melhorar o desempenho de sementes submetidas a estresses porque promove a remoção de radicais livres presentes nas células dos tecidos vegetais de sementes deterioradas. Neste contexto, objetivou-se investigar os efeitos do uso de solução de ácido bórico no preparo das sementes para a extração, sobre o crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de café. Foram utilizados lotes de diferentes níveis de qualidade de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, obtidos de sementes recém colhidas ou submetidas ao envelhecimento acelerado por quatro ou seis dias. As sementes foram embebidas em água e em ácido bórico antes da extração dos embriões, que em seguida foram extraídos de forma asséptica e inoculados em meio MS. Foram avaliadas a presença de folhas e de raízes aos 15 dias, a germinação aos 30 dias e o tamanho de hipocótilo e de raízes aos 120 dias. A adição de ácido bórico na água de embebição das sementes proporciona plântulas mais vigorosas na cultura dos embriões.

**PALAVRAS-CHAVE:** Deterioração; *Coffea arabica* L.; Cultura de embriões.

## *IN VITRO* CULTIVATION OF COFFEE ZYGOTIC EMBRYOS USING BORIC ACID SOLUTION

**ABSTRACT:** Coffee seeds are stored for a short period of time due to their rapid loss of viability, which makes it difficult to obtain seedlings with a desirable quality standard at the ideal time for planting. Recent studies have confirmed the existence of greater sensitivity of coffee seeds endosperms than of the zygotic embryos, which can germinate and form a normal seedling when isolated from a deteriorated seed. The use of antioxidants can improve the performance of stressed seeds through the removal of free radicals present in the cells of deteriorated seed plant tissues. In this context, the objective was to investigate the effects of the use of boric acid solution in the preparation of seeds for extraction on *in vitro* growth of coffee zygotic embryos. Seed lots of different quality levels of *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, were obtained from seeds recently harvested or subjected to accelerated aging for four or six days. The seeds were soaked in water and boric acid before embryo extraction, which was then aseptically extracted and inoculated in MS medium. The presence of leaves and roots was evaluated at 15 days, germination at 30 days, and the size of the hypocotyl and of roots at 120 days. The addition of boric acid to the water for soaking seeds leads to more vigorous seedlings in cultivation of embryos.

**KEY WORDS:** Deterioration; *Coffea arabica* L.; Embryo culture.

## INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos de maior importância no mercado mundial e o Brasil é o maior produtor e exportador mundial desta commodity, com uma produção de 61,7 milhões de sacas, segundo dados da CONAB (2018). Este cenário evidencia a importância da realização de pesquisas nas mais diversas áreas de produção do café.

A espécie *Coffea arabica* L. é propagada geralmente por mudas produzidas por sementes. No entanto, um grande problema na produção de mudas é que, além de baixo potencial de armazenamento, as sementes apresentam germinação lenta e desuniforme, o que torna difícil a obtenção de mudas com elevado padrão de qualidade, no momento ideal ao plantio (Rosa et al., 2010).

De acordo com resultados de diversas pesquisas (Coelho et al., 2015; Dussert et al., 2006) o endosperma de sementes de café apresenta uma maior sensibilidade do que os embriões à deterioração e maior susceptibilidade aos danos de

processamento, secagem e armazenamento. Nestes trabalhos os embriões isolados das sementes apresentaram melhor desempenho fisiológico do que as sementes inteiras, principalmente quando as sementes apresentavam baixa qualidade fisiológica.

A cultura de embriões zigóticos de café pode auxiliar na regeneração de mudas a partir de sementes com baixa qualidade fisiológica. No entanto, o cultivo *in vitro* apresenta alguns desafios como a contaminação por microrganismos e a oxidação fenólica que podem ser minimizados com o uso de soluções fungicidas e antioxidantes.

O ácido bórico tem diversas propriedades, como micronutriente essencial para as plantas, antisséptico, bacteriostático, controle de bactérias, algas, fungos e insetos, e controle da biodeterioração (Lloyd, 1998). Como fungicida ele impede o crescimento do fungo pela prevenção da formação de conídios ou esporos assexuados (Woods, 1994). Em estudos *in vitro* o boro inibiu de forma efetiva *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Monilinia laxa* (Qin et al., 2007, 2010; Thomidis; Exadaktylou, 2010). Além disso, o boro é responsável pela queda na concentração de compostos fenólicos, a deficiência de boro aumenta a atividade da enzima polifenol oxidase, que catalisa a oxidação de compostos fenólicos (Camacho-Cristóbal; Anzelotti; González-Fontes, 2002).

Neste contexto, objetivou-se investigar os efeitos do uso de solução de ácido bórico no preparo das sementes para a extração dos embriões zigóticos de café, sobre o seu crescimento *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados lotes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, com três níveis e qualidade, obtidos de sementes recém colhidas e de sementes submetidas ao envelhecimento acelerado por quatro dias ou seis dias.

As sementes provenientes dos três lotes foram submetidas ao processo de assepsia realizada por embebição em formaldeído por 20 minutos, em agitação, seguida de lavagem com água destilada e autoclavada, três vezes. Após assepsia, as sementes foram embebidas por 72 horas em água destilada autoclavada ou em solução de 0,5% de ácido bórico, constituindo dois tratamentos de embebição. Antes da extração dos embriões, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e, posteriormente à embebição das sementes, os embriões zigóticos foram extraídos em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinça. Os embriões extraídos foram armazenados em água destilada autoclavada, filtrada em filtro Millex GP de 0,22 µm de diâmetro de poro. Os embriões foram então, inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio MS autoclavado (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com sacarose e solidificado com phytigel, com pH ajustado para 5,8. Os tubos foram vedados com tampa de polipropileno e papel filme, contendo um embrião por tubo, perfazendo 40 tubos por tratamento. Os embriões inoculados foram então, mantidos em câmara BOD, sob 25°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e, posteriormente foram realizadas as seguintes avaliações.

*Presença de folhas e raízes e germinação in vitro dos embriões:*

Após 15 dias de inoculação, foram computados os embriões que apresentavam folhas ou raízes e, aos 30 dias, foi avaliada a porcentagem de germinação dos eixos embrionários, considerando germinados os que apresentaram crescimento dos cotilédones e protrusão radicular.

*Análise de crescimento in vitro das plântulas:*

Após 120 dias, quando as plântulas apresentavam crescimento da parte aérea e do sistema radicular, foi realizada a medição do comprimento do sistema radicular (cm) e do hipocótilo (cm).

*Delineamento experimental:*

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x2, sendo três níveis de qualidade fisiológica das sementes e dois protocolos de preparo das sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR® (Ferreira, 2011), sendo que os grupos de médias foram comparados por meio do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de café são afetados pela adição de ácido bórico na água de embebição, durante a preparação das sementes para a extração dos embriões, sendo este efeito influenciado pelo nível de qualidade das sementes. Também foi constatado que a adição de ácido bórico na água de embebição das sementes causou efeito altamente significativo nas sementes recém colhidas e nas sementes envelhecidas por 6 dias, verificado pela porcentagem de embriões com presença de folhas e de raízes aos 15 dias de cultivo *in vitro* dos embriões (Tabela 1).

Já na avaliação dos embriões extraídos de sementes envelhecidas por quatro dias não foram observadas diferenças significativas com a adição do ácido bórico na água de embebição das sementes (Tabela 1). Este resultado pode ser atribuído à possibilidade de que o período de 15 dias de crescimento ainda era insuficiente para a avaliação do crescimento dos embriões *in vitro*, uma vez que aos 120 dias já foi observado efeito da adição do ácido bórico na água de embebição das sementes sobre a germinação e comprimento de hipocótilos e de raízes, independentemente do período em que as sementes foram envelhecidas (Tabela 2). Este fato evidencia o efeito positivo da adição do ácido bórico na água de embebição, durante o preparo das sementes de café para a extração dos embriões.

Tabela 1. Presença de raiz primária e de folhas cotiledonares aos 15 dias de inoculação de embriões de café extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade e embebidas em água ou em ácido bórico.

Lotes de sementes (Tempos de envelhecimento acelerado)	Presença de Raízes (%)		Presença de Folhas (%)	
	Embebição das sementes			
	Em água destilada	Em ácido bórico	Em água destilada	Em ácido bórico
0 dias	15 b B	95 a A	25 b B	97,5 a A
4 dias	55 a A	72,5 a B	60 a A	55 a B
6 dias	0 b B	50 a C	0 b C	57,5 a B
CV	30,22%		29,36	

Médias seguidas das mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Germinação e comprimento de hipocótilos e de raízes aos 120 dias de inoculação, de plântulas de café oriundas de embriões extraídos de sementes com diferentes níveis de qualidade, embebidas em água ou em ácido bórico.

Lotes de sementes (Tempos de envelhecimento acelerado)	Germinação (%)		Hipocótilo (cm)		Raiz (cm)	
	Embebição das sementes					
	Em água destilada	Em ácido bórico	Em água destilada	Em ácido bórico	Em água destilada	Em ácido bórico
0 dias	22,5 b B	95 a A	0,11 b B	0,87 a B	0 b B	2,5 a A
4 dias	62,5 b A	87,5 a B	0,81 b A	1,03 a A	1,5 b A	2,75 a A
6 dias	0 b C	67,5 a B	0 b B	1,00 a A	0 b B	1,5 a B
CV (%)	26,02		52,43		33,20	

Médias seguidas das mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Com os resultados destes estudos fica evidente que o uso da solução de ácido bórico no preparo das sementes é necessário e benéfico para a cultura de embriões de café. Nota-se na Tabela 2, que mesmo nos embriões extraídos de sementes com mais baixa qualidade, ou seja, aquelas que foram envelhecidas por seis dias, houve vantagem ao se utilizar a solução de ácido bórico, uma vez que a embebição das sementes em apenas água não propiciou germinação e nem desenvolvimento de plântulas. Os resultados dão indícios do efeito antioxidante que o ácido bórico pode proporcionar sob os tecidos vegetais (Cakmak; Römheld, 1997; Camacho-Cristóbal; Anzelotti; González-Fontes, 2002). Além disso, diversos autores afirmam que o ácido bórico apresenta um efeito fungicida (Woods, 1994; Qin et al., 2007, 2010; Thomidis; Exadaktylou, 2010), o que também pode ter influenciado nos resultados, uma vez que muitos embriões não germinaram devido à morte por contaminações.

## CONCLUSÕES

1 - A adição de ácido bórico na água de embebição de sementes é necessário e proporciona plântulas mais vigorosas após a cultura dos embriões.

## AGRADECIMENTOS

À UFPA, CAPES, FAPEMIG, CNPQ e Fundação Procafé.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAKMAK, I. & RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* 193: 71-83. (1997).
- COELHO, S. V. B; FIGUEIREDO, M. A.; CLEMENTE, A. D.; COELHO, L. F. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 483-491. (2015).
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Safra 2018 - Quarto levantamento, dezembro 2018. Brasília: Conab, v. 5, p. 80. (2018).

- DUSSERT, S.; DAVEY, M. W.; LAFFARGUE, A.; DOULBEAU, S.; SWENNEN, R.; ETIENNE, H. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiologia Plantarum* 127: 192-204. (2006).
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042. (2011).
- LLOYD, J. D. Borates and their biological applications. The International Research Group on Wood Preservation. Doc IRG/WP 98-30178. IRG Secretariat Stockholm, Sweden, 1998. 25 p.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology* 15: 473-479. (1962).
- PFEFFER, H.; DANNEL, F. & R'OMHELD, V. Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? *Physiologia Plantarum* 104: 479-485. (1998).
- QIN, G. Z.; TIAN, S.; CHAN, Z.; LI, B. Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 425-438. (2007).
- QIN, G. Z.; ZONG, Y.; CHEN, Q.; HUA, D.; TIAN, S. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology* 138: 145-150. (2010).
- ROSA, S.D.V.F.; MCDONALD, M. B.; VEIGA, A. D.; VILELA, F. D. L.; FERREIRA, I. A. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. *Seed Science and Technology* 38:421-431. (2010).
- THOMIDIS, T. & EXADAKTYLOU, E. Effect of boron on the development of brown rot (*Monilinia laxa*) on peaches. *Crop Protection* 29: 572-576. (2010).
- WOODS, W.G. An introduction to boron: History, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspectives* 102: 5-11. (1994).