

35º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras

INFLUÊNCIA DA IDADE DA FOLHA NO ESTABELECIMENTO DE *COFFEA CANEPHORA IN VITRO*: EFEITO NA DESINFESTAÇÃO, NA OXIDAÇÃO E NA FORMAÇÃO DE CALOS

W. P. Rodrigues – Graduando em Agronomia UENF, wevertonuenf@hotmail.com, V.S. Carvalho – Pós-Doutoranda em Produção Vegetal UENF, virginia@uenf.br, M.A. Biazatti – Graduando em Agronomia UENF, M.F. Neto – Mestranda em Melhoramento Genético Vegetal UENF, moniquebiol@bol.com.br, K.C. Martins – Mestranda em Melhoramento Genético Vegetal UENF,

O café é propagado comercialmente via sementes ou estacas. Quando pela via seminífera, podem ocorrer comportamentos indesejáveis devido à variação genética, ao longo período juvenil das mudas formadas e ao curto período de viabilidade das sementes devido a sua recalcitrância. Por outro lado, a propagação vegetativa do cafeeiro pelo método de estaquia garante uniformidade genética, porém pode apresentar baixas taxas de multiplicação e dificuldade no enraizamento. Portanto, a multiplicação via cultura de tecidos é uma alternativa viável para a propagação do cafeeiro, permitindo a produção de plantas geneticamente uniformes numa escala massiva e num período de tempo mais curto (Almeida, 2007).

Segundo Teixeira (2005), órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfestação e para minimizar essas contaminações é recomendável cultivar a planta matriz, da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas como telados com cobertura plástica ou casas de vegetação. O cultivo de plantas nesses ambientes permite maior controle da irrigação, da adubação e de pragas e doenças. Outro empecilho para o estabelecimento da cultura *in vitro* em *Coffea canephora* é a presença de grande quantidade de compostos fenólicos, causando oxidação dos explantes e impedindo a formação de calos.

O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta à desinfestação, à oxidação e à formação de calos de explantes oriundos de folhas recém formadas e de folhas adultas de *C. canephora*.

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado e foi composto de dois tratamentos (folhas recém formadas e folhas adultas) e 80 repetições. Foram utilizadas como fontes doadoras de explantes, mudas de *C. canephora* mantidas em casa de vegetação do LFIT que receberam uma aplicação de Amistar® (0,5g L⁻¹) sete dias antes da coleta. No início da manhã, foram coletadas folhas recém formadas e adultas, com 4 e 10 cm, respectivamente. Após a coleta, as folhas foram lavadas em água, cortadas para retirada da nervura principal e desinfestadas superficialmente com algodão embebido em álcool 70%. Em seguida foram submersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e Tween 20 (três gotas para cada 100 mL) e mantidas nessa solução por 15 minutos sob agitação em câmara de fluxo laminar. Após esse período, as folhas foram lavadas em água deionizada estéril três vezes nos tempos de 5, 15 e 25 minutos, sob agitação. Para inoculação no meio de cultura, as folhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 1cm² em placas de Petri contendo solução de ácido

ascórbico (600 mg L⁻¹) estéril para evitar a oxidação dos tecidos. Os explantes foram inoculados com o lado abaxial em contato com o meio de cultura em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio. Cada tubo de ensaio recebeu um explante. O meio de cultura foi composto pelos sais minerais do meio MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 2 mg L⁻¹ de 2,4D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), pH 5,7 e solidificado com 10 g L⁻¹ de ágar Vetec[®]. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 121°C e pressão de 1,5 atm.

Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram levados para sala de cultivo e mantidos no escuro a temperatura de 27 ± 2 °C.

Resultados e conclusões

O experimento foi avaliado após 45 dias de cultivo *in vitro*. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Resultados preliminares (dados não publicados) demonstraram elevada contaminação (75%) quando as folhas foram retiradas de plantas oriundas do campo. Dessa forma, foram retirados explantes de plantas cultivadas em casa de vegetação e tratadas com fungicida com o intuito de reduzir a contaminação inicial. As folhas recém formadas quase não apresentaram contaminação (1,25%) enquanto que as folhas adultas apresentaram um nível bem mais elevado (33,75%). Órgãos cronologicamente mais velhos apresentam-se mais contaminados do que os mais jovens devido à exposição por mais tempo aos contaminantes. Embora a contaminação nos explantes retirados de folhas adultas tenha sido alta (33,75%) houve uma redução de mais de 50% quando comparada com os explantes oriundos de plantas cultivadas a campo.

Dos explantes obtidos das folhas recém formadas 33,75% formaram calo e dos explantes obtidos de folhas adultas 20%. A porcentagem de calo formado no presente experimento condiz com os dados obtidos na literatura. Como exemplo, Saito e Neto (2008) avaliando diferentes concentrações de ANA (ácido naftalenoacético), 2,4D e KIN (cinetina) em *Coffea arabica* cv Obatã obtiveram 31,3% de segmentos que regeneram calo no melhor tratamento (meio MS ½ força, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 10 mg L⁻¹ de tiamina, 1 mg L⁻¹ de glicina, 1 mg L⁻¹ de piridoxina e 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 6 g L⁻¹ ágar e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4D).

A oxidação foi maior nas folhas recém formadas (65%) embora as folhas adultas também tenham apresentado elevada oxidação (46,25%). As folhas jovens apresentaram maior oxidação provavelmente devido ao fato de possuírem tecidos mais tenros e, portanto, mais sensíveis a ação do hipoclorito de sódio.

Tabela 1 – Níveis de contaminação, oxidação e formação de calos em explantes obtidos de folhas recém formadas e folhas adultas.

Explante	Contaminação (%)	Formação de calo (%)	Oxidação (%)
Folhas recém formadas	1,25	33,75	65,00
Folhas adultas	33,75	20,00	46,25

A partir destes dados preliminares, novos experimentos estão sendo conduzidos, utilizando folhas recém formadas como explantes, no intuito de aperfeiçoar os métodos de desinfestação, as concentrações dos reguladores de crescimento no meio de cultura, as concentrações e os tipos de antioxidantes para definir protocolos de multiplicação *in vitro* de *C. canephora* cv Vitória via embriogênese somática a partir de segmentos de folhas. Este trabalho é uma parceria da UENF com o INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural) e tem como finalidade desenvolver protocolos para multiplicação *in vitro* para os 13 clones de *C. canephora* cv. Vitória.