

DESINFESTAÇÃO E CONTROLE DA MICROFLORA PATOGENICA NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* EM *COFFEA*

João Paulo de Moraes Oliveira, Aline dos Santos Bergamin, Gustavo Fernandes Mariano, Loren Cristina Vasconcelos, Elias Terra Werner, André da Silva Xavier, Milene Miranda Praça Fontes

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, joaopaulo.ueg@gmail.com, alinebergamin258@hotmail.com, gustavo.mariano@edu.ufes.br, loren-vasconcelos@hotmail.com, elias.werner@ufes.br, xavierandre23@hotmail.com, mileneufes@gmail.com.

Resumo

A cultura de tecido vegetal é essencial para a propagação e pesquisa de plantas, permitindo o cultivo em condições controladas. A desinfestação é desafiadora devido à necessidade de eliminar contaminantes sem danificar os tecidos. O estabelecimento *in vitro* de *Coffea* depende de métodos adequados de desinfestação, sem impactar a viabilidade dos explantes. Este estudo analisou a eficácia de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, dos fungicidas Across®, Captan® e Manzate®, e suas combinações com Tetraciclina na desinfestação de explantes foliares e sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Folhas e sementes de plantas adultas de *C. arabica* e *C. canephora* foram coletadas no campo experimental e utilizadas para inoculação *in vitro*. O hipoclorito de sódio em ambas as concentrações testadas não foi eficiente, exibindo altas taxas de infecção por microflora patogênica. Os fungicidas estudados mostraram melhor eficiência no controle das infecções, destacando-se a combinação de Across® mais Manzate® com Tetraciclina.

Palavras-chave: Café. Controle Químico. Cultura de Tecido Vegetal. Estabelecimento *In Vitro*.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônômica.

Introdução

A cultura de tecido vegetal é uma técnica essencial na propagação e pesquisa de plantas, oferecendo inúmeras vantagens para a agricultura e a biotecnologia. Permite a produção de plantas geneticamente uniformes e livres de doenças, facilitando a clonagem de variedades superiores e a conservação de espécies ameaçadas. Além disso, acelera e otimiza os programas de melhoramento genético, possibilitando múltiplas gerações de plantas em um período de tempo reduzido (Sanglard *et al.*, 2019). A cultura de tecido vegetal também pode ser utilizada para induzir mutações e selecionar variantes somaclonais, contribuindo para a diversificação genética e o desenvolvimento de novas cultivares (Oliveira *et al.*, 2021). Essa técnica é especialmente relevante para culturas de alto valor comercial, como o café, onde a demanda por plantas com características específicas é elevada. Assim, a cultura de tecido vegetal aprimora os programas de melhoramento genético, fomentando a inovação e promovendo a sustentabilidade na agricultura moderna.

Em *Coffea*, a cultura de tecido vegetal é marcada por avanços significativos e desafios persistentes. Nessa cultura, a utilização de técnicas de cultura de tecido vegetal tem ganhado mais destaque nas últimas décadas, visando a produção eficiente de mudas livres de doenças e geneticamente uniformes (Oliveira *et al.*, 2021). No entanto, um dos principais gargalos enfrentados é a desinfestação eficaz dos explantes, devido à suscetibilidade dessas plantas à contaminação por fungos, bactérias e vírus. A superação desse desafio requer a aplicação rigorosa de protocolos de desinfestação, incluindo o uso de agentes químicos como hipoclorito de sódio e fungicidas (Da Silva *et al.*, 2015). O uso de fungicidas de amplo espectro no meio de cultura pode ser uma alternativa viável para reduzir as infecções por microflora patogênica, viabilizando e aumentando a taxa de sucesso dos cultivos *in vitro*.

A escolha dos fungicidas, bem como suas concentrações e combinações no meio de cultura, são determinantes para a eficácia no controle das infecções por microflora patogênica. Doses muito baixas podem não fornecer proteção adequada contra contaminações, enquanto doses excessivas podem ser

tóxicas e afetar a viabilidade dos explantes, sendo indesejáveis. Estudos indicam que a escolha da concentração de fungicida depende da sensibilidade da espécie vegetal em questão e do tipo de fungo que se pretende controlar (Bhattacharjee, Dey, 2014; El-Baky, Amara, 2021). Portanto, é essencial realizar testes preliminares para determinar a dose recomendada do fungicida, levando em consideração o tipo de explante, o tempo de exposição e outros fatores experimentais relevantes. Vale ressaltar que os fungicidas já possuem dosagem recomendada descrita na bula para condições de campo, e esse parâmetro é útil uma vez que pode servir como uma margem para testagem *in vitro*.

Assim, objetivamos investigar as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes (folhas e sementes); os efeitos das diferentes concentrações de fungicidas Across®, Captan® e Manzate®, tanto isoladamente, em combinação e com a adição de Tetraciclina incorporados ao meio de cultura no controle das infecções por microflora patogênica; monitorar o efeito dos fungicidas sobre a viabilidade dos explantes foliares e das sementes inoculadas *in vitro*; e estabelecer *in vitro* as espécies de *C. arabica* e *C. canephora*.

Metodologia

Folhas completamente expandidas e em boas condições fitossanitárias de *C. arabica* (var. akauã) e *C. canephora* (var. conquista) foram coletadas da área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizada no município de Alegre – ES, Brasil. As folhas coletadas foram lavadas em água corrente com detergente neutro por 20 min e imersas em álcool 70% por 1 min. Em seguida, as folhas foram imersas por 30 min em solução de hipoclorito de sódio à 1,5% ou 3%, com adição de uma gota de Tween 20 a cada 100 mL. Após esse processo, as folhas passaram por três ciclos de lavagem em água destilada e foram encaminhadas para inoculação.

Explantes foliares (~1cm²) de *C. arabica* e *C. canephora* foram excisados, e cinco fragmentos foram inoculados em placa de Petri contendo meio de indução de calogênese, constituído de 2,15 g L⁻¹ de MS meia força, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,08 g L⁻¹ L-cisteína, 0,4 g L⁻¹ de extrato de malte, 0,1 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 9,06 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 4,44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,8 g L⁻¹ de fitigel, pH = 5,6. O meio de cultura foi vertido nas placas de Petri com e sem os fungicidas Across®, Captan® e Manzate®. Os fungicidas foram filtrados em ambientes estéril e inoculados individualmente ao meio de cultura nas concentrações de 5 e 10 µL por mL de meio, à 50°C. Após 30 dias, os explantes foliares foram transferidos para um novo meio de calogênese sem fungicida. As placas de Petri foram mantidas no escuro a 25 ± 2 °C. Por meio desse ensaio inicial, observamos o potencial dos fungicidas estudados, ajustando as concentrações e suas combinações para otimizar o controle das infecções por microflora patogênica.

Um novo ensaio foi montado para as duas espécies, seguindo os mesmos procedimentos de desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 1,5%. O meio de indução de calogênese permaneceu o mesmo, aumentando as concentrações dos fungicidas para 100 e 200 µL por mL de meio, com as combinações de Across® (100 µL) + Manzate® (100 µL), Across® (200 µL) + Manzate® (200 µL), Captan® (100 µL) + Manzate® (100 µL) e Captan® (200 µL) + Manzate® (200 µL), além da adição de 1 µL de Tetraciclina por mL de meio. Tetraciclina foi adicionada ao meio de cultura para conter as infecções bacterianas. Após 30 dias, os explantes foliares foram transferidos para um novo meio de calogênese sem fungicidas e bactericidas. As placas de Petri foram mantidas no escuro a 25 ± 2 °C.

O melhor tratamento de desinfestação para os explantes foliares foi aplicado para as sementes de *C. arabica* e *C. canephora*. As sementes foram coletadas de plantas adultas em boas condições fitossanitárias na área experimental da UFES, localizada no município de Alegre – ES, Brasil. Essas sementes foram lavadas em água corrente com detergentes neutro por 20 min e imersas em álcool 70% por 1 min. Em seguida, foram imersas por 30 min em solução de hipoclorito de sódio à 1,5% ou 3%, com adição de uma gota de Tween 20 a cada 100 mL. Após esse processo, as sementes passaram por três ciclos de lavagem em água destilada e foram encaminhadas para inoculação. Uma semente foi inoculada por tubo de ensaio contendo o meio de germinação, constituído de 2,15 g L⁻¹ de MS meia força, 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de agar, pH = 5,6, com ou sem a presença de fungicida. Os fungicidas Across® e Manzate® foram filtrados em ambientes estéril e inoculados no meio de germinação em combinação de 200 µL de Across®, 200 µL de Manzate® e 1 µL de Tetraciclina por mL de meio, à 50°C. Após 30 dias, as sementes foram transferidas para um novo meio de germinação sem fungicidas e bactericidas. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento sob regime

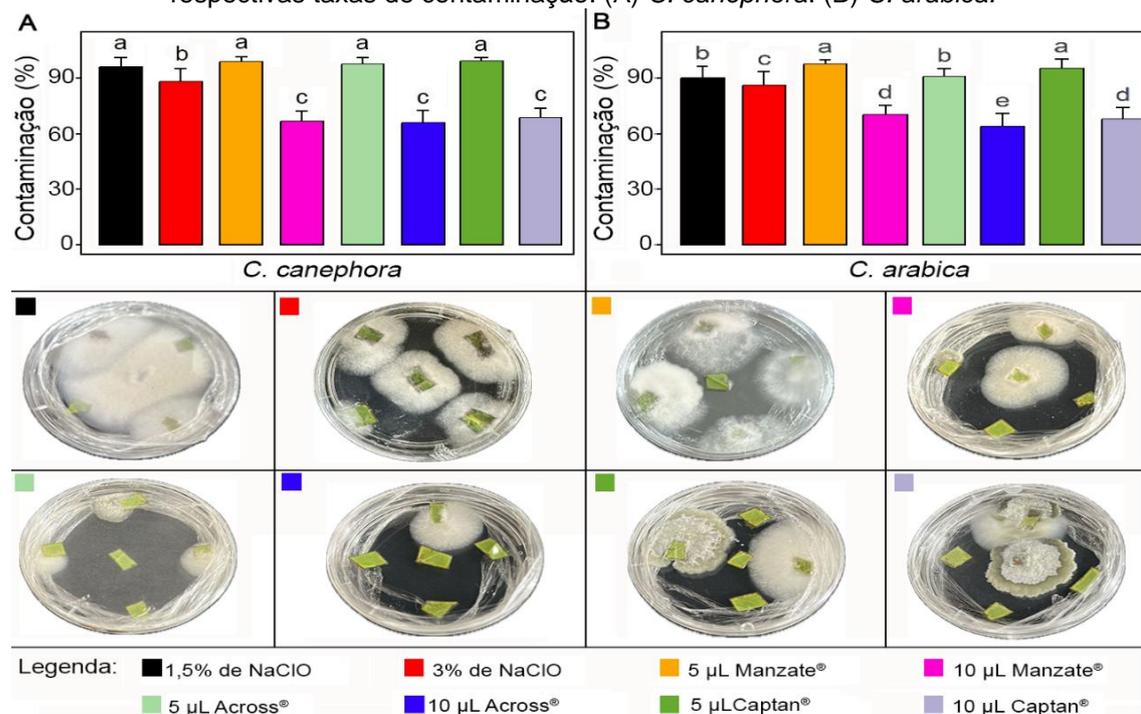
claro/escuro de 16/8 h com $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20 W, Osram®), a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com 100 repetições para cada tratamento, considerando o tipo de material biológico (explantes foliares e sementes), as concentrações de hipoclorito de sódio e dos fungicidas, suas combinações e as espécies analisadas. Aplicou-se o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Confirmada a normalidade, procedeu com análise de variância e o teste de *Scott-Knott*.

Resultados

Os processos de desinfestação e controle da microflora patogênica em *C. canephora* e *C. arabica* diferiram entre si e mostraram-se eficientes. A concentração de 3% de hipoclorito de sódio foi mais eficaz na desinfestação e no controle da microflora patogênica em explantes foliares do que a concentração de 1,5%. Além disso, superou os fungicidas Across®, Captan® e Manzate® que estavam na concentração de 5 μL por mL de meio (Fig. 1). Apesar disso, a taxa de contaminação por microflora patogênica foi elevada, chegando a 89% para *C. canephora* e 87% para *C. arabica*, os explantes foliares exibiram danos oxidativos. Em *C. canephora*, os fungicidas Across®, Captan® e Manzate® na concentração de 10 μL por mL de meio foram promissores, retardando o crescimento da microflora patogênica e reduzindo a taxa de contaminação para 71%, 69% e 72%, respectivamente (Fig.1A). Em *C. arabica*, os fungicidas Across®, Captan® e Manzate® na concentração de 10 μL por mL de meio diferiram entre si (Fig. 1B). O Across® foi mais eficiente no retardamento do crescimento da microflora patogênica, reduzindo a taxa de contaminação para 65%, enquanto Manzate® e Captan® exibiram taxas de contaminação de 73% e 71%, respectivamente. Manzate® demonstrou maior eficiência contra um tipo de microflora patogênica de coloração creme esverdeada, sendo posteriormente testada em combinação com os outros fungicidas.

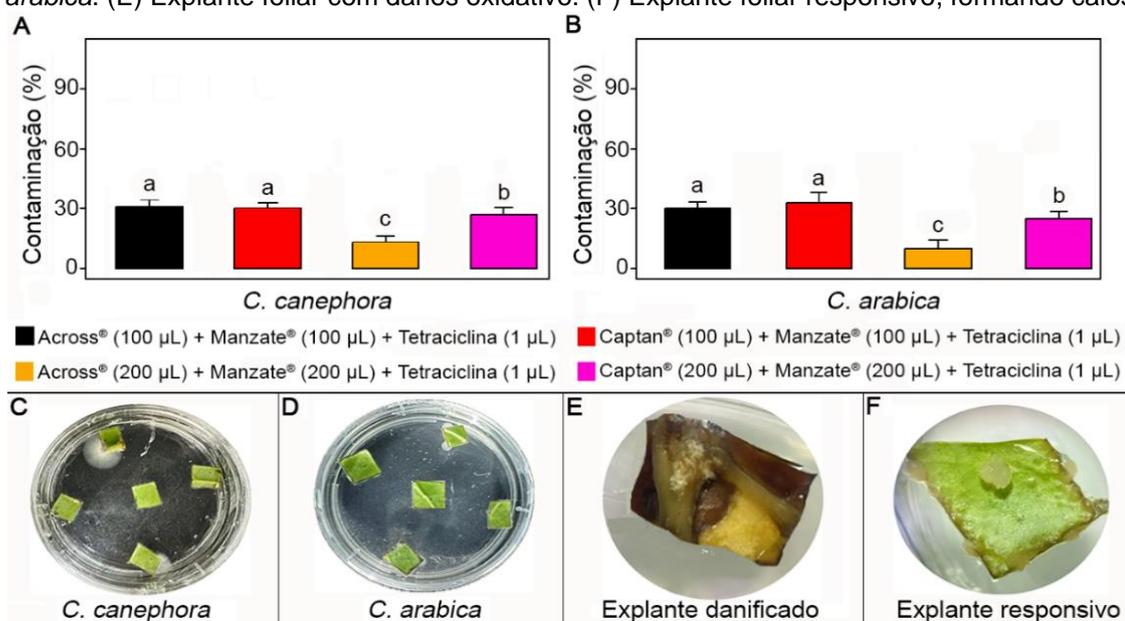
Figura 1 – Métodos de desinfestação de explantes foliares em *C. canephora* e *C. arabica* e suas respectivas taxas de contaminação. (A) *C. canephora*. (B) *C. arabica*.



As combinações de Across® (100 μL) + Manzate® (100 μL), Captan® (100 μL) + Manzate® (100 μL), Across® (200 μL) + Manzate® (200 μL) e Captan® (200 μL) + Manzate® (200 μL), com a adição de 1 μL de Tetraciclina por mL de meio, otimizaram o processo de desinfestação e o controle da microflora patogênica em explantes foliares de *C. canephora* e *C. arabica* (Fig. 2). A combinação de Across® (200

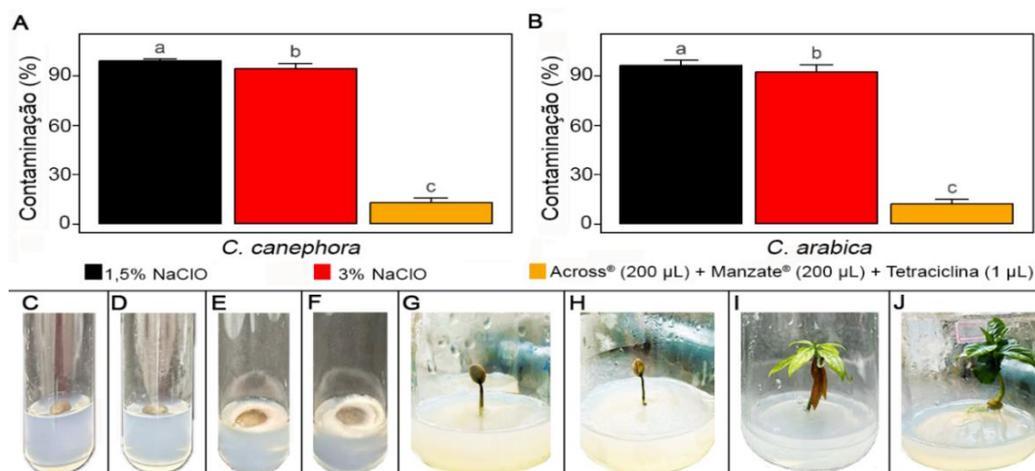
μL) + Manzate® (200 μL) + Tetraciclina (1 μL) foi a mais eficaz para desinfestação e controle da microflora patogênica, reduzindo a taxa de contaminação para 13% em *C. canephora* e 10% em *C. arabica* (Fig. 2A-B). A combinação de Captan® (200 μL) + Manzate® (200 μL) + Tetraciclina (1 μL) também foi eficaz para a desinfestação e controle da microflora patogênica, reduzindo a taxa de contaminação para 25% em *C. canephora* e 22% em *C. arabica*. Além disso, a combinação de Across® (100 μL) + Manzate® (100 μL) + Tetraciclina (1 μL) e Captan® (100 μL) + Manzate® (100 μL) + Tetraciclina (1 μL) também mostraram eficácia, reduzindo a taxa de contaminação para 32% e 30% em *C. canephora* e 30% e 33% em *C. arabica*, respectivamente (Fig. 2C-D). Entretanto, os explantes foliares foram sensíveis a essas concentrações e combinações e exibiram danos oxidativos (Fig. 2E).

Figura 2 – Eficácia das concentrações e combinações dos fungicidas Across®, Captan® e Manzate®, juntamente com tetraciclina, na desinfestação e controle da microflora patogênica em explantes foliares de *C. canephora* e *C. arabica*. (A) Taxa de contaminação em *C. canephora*. (B) Taxa de contaminação em *C. arabica*. (C) Controle e inibição da microflora patogênica em explantes foliares de *C. canephora*. (D) Controle e inibição da microflora patogênica em explantes foliares de *C. arabica*. (E) Explante foliar com danos oxidativo. (F) Explante foliar responsivo, formando calos.



Os métodos de desinfestação e controle da microflora patogênica na germinação de sementes de *C. canephora* e *C. arabica* apresentaram diferenças significativas (Fig. 3). A desinfestação com 1,5% e 3% de NaClO resultou em uma taxa de contaminação superior a 90% para ambas as espécies. No entanto, a combinação de Across® (200 μL) + Manzate® (200 μL) + Tetraciclina (1 μL), otimizou o processo de desinfestação e o controle da microflora patogênica, reduzindo a taxa de contaminação para menos de 13%. Além disso, essa combinação não apresentou toxicidade para as sementes, alcançando uma taxa de germinação de 72% para *C. arabica* e 69% para *C. canephora*, viabilizando o estabelecimento *in vitro* dessas espécies (Fig. 3G-J).

Figura 3 – Métodos de desinfestação e eficácia das concentrações e combinações dos fungicidas Across® e Manzate®, juntamente com tetraciclina, na desinfestação e controle da microflora patogênica em sementes de *C. canephora* e *C. arabica*. (A) Taxa de contaminação em *C. canephora*. (B) Taxa de contaminação em *C. arabica*. Semente de *C. canephora* (C) e *C. arabica* (D) livre de contaminação. Semente contaminada de *C. canephora* (E) e *C. arabica* (F). Germinação de semente *in vitro* de *C. canephora* (G) e *C. arabica* (H). Plântulas *in vitro* de *C. canephora* (I) e *C. arabica* (J).



Discussão

A desinfestação e o controle da microflora patogênica são etapas cruciais no cultivo *in vitro* em *Coffea*, dada à alta suscetibilidade dos explantes a contaminações. Os resultados evidenciam que a concentração de 3% de hipoclorito de sódio foi mais eficaz na desinfestação em comparação com a concentração de 1,5%, porém ambas resultaram em elevadas taxas de contaminação. O hipoclorito de sódio é um agente desinfetante que age por meio da liberação de cloro ativo, oxidando componentes celulares críticos de microrganismos, como as proteínas e ácidos nucleicos (Da Silva *et al.*, 2015). Em concentrações mais elevadas, como 3%, há uma maior disponibilidade de cloro ativo, resultando em uma ação mais intensa e rápida contra os microorganismos. Contudo, deve-se considerar que concentrações mais altas de hipoclorito de sódio, apesar de mais eficazes, também aumentam o risco de causar danos aos tecidos vegetais (Da Silva *et al.*, 2016). Esse efeito é um fator limitante, pois a viabilidade dos explantes deve ser mantida para o sucesso do cultivo *in vitro*. Além disso, a eficácia de desinfetantes como o hipoclorito de sódio também depende da estrutura e resistência dos microrganismos presentes. Alguns patógenos podem ser mais resistentes e exigir uma concentração mais alta para serem efetivamente eliminados (Da Silva *et al.*, 2015; El-Baky, Amara, 2021).

Os fungicidas Across®, Captan® e Manzate® foram mais eficazes na desinfestação dos explantes foliares de *C. canephora* e *C. arabica* do que o hipoclorito a 1,5% e 3%, o que pode ser explicado pelas diferenças nos mecanismos de ação e pela maior especificidade desses fungicidas. O hipoclorito de sódio é um desinfetante oxidante que atua de forma ampla, oxidando proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos em uma variedade de microrganismos, mas não é específico para fungos (Da Silva *et al.*, 2015). Especialmente em concentrações baixas, pode falhar em penetrar nas estruturas mais resistentes de certos fungos, como esporos e hifas (Da Silva *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016). Além disso, o hipoclorito de sódio não fornece proteção contínua. Por outro lado, os fungicidas Across®, Captan® e Manzate® foram desenvolvidos especificamente para combater fungos, e cada um tem um mecanismo de ação. Captan® é um fungicida não sistêmico, com ação preventiva, utilizado no controle de doenças fúngicas. Manzate® é um fungicida protetor, multissítio de ação indicado para diversas culturas, controlando/impedindo o crescimento e a proliferação de fungos. Across® é um fungicida que combina modos de ação sistêmico e de contato, formulado a partir de três grupos químicos: estrobilurina, triazol e Isotalonitrila. Portanto, esses fungicidas são eficientes para eliminar os fungos e atuar de forma preventiva, evitando a reinfecção.

Os resultados também demonstram que a combinação dos fungicidas Across® + Manzate® e Captan® + Manzate®, nas concentrações de 100 e 200 µL, com a adição de 1 µL de tetraciclina por mL de meio, reduz drasticamente as infecções por microflora patogênica. Essa redução pode ser atribuída à ação sinérgica entre os diferentes agentes, que juntos potencializam o seu efeito, atacando múltiplos alvos celulares nos patógenos e ampliando o espectro de ação (El-Baky, Amara, 2021). A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro que, embora seja mais conhecida por sua eficácia contra bactérias, também pode ter efeitos supressores sobre certos tipos de microflora fúngica que coabitam os explantes (Bhattacharjee, Dey, 2014). O aumento da concentração dos fungicidas forneceram uma dose suficientemente forte para garantir que mesmo os patógenos mais resistentes sejam inibidos ou

eliminados (Da Silva *et al.*, 2016). No entanto, é importante notar que o aumento na concentração de fungicidas deve ser cuidadosamente balanceado para evitar efeitos fitotóxicos nos explantes. Neste estudo, os resultados indicam que, embora a combinação desses agentes tenha sido eficaz na redução da contaminação, também causou danos aos explantes foliares de *C. canephora* e *C. arabica*. Em contraste, as sementes dessas espécies não apresentaram danos e não tiveram sua germinação afetada, sugerindo que as concentrações foram otimizadas.

Conclusão

Os fungicidas Across® , Captan® e Manzate® , utilizados em concentrações de 100 e 200 µL, foram eficazes na eliminação da microflora patogênica. A combinação desses fungicidas com tetraciclina reduziu drasticamente as infecções e causou danos oxidativos aos explantes foliares. Em contraste, as sementes não apresentaram danos, indicando que as concentrações foram otimizadas já que não afetaram a sua germinação e cultivo *in vitro*.

Referências

- BHATTACHARJEE, R.; DEY, U. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 17, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6356>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- DA SILVA, J.A.T., WINARTO, B., DOBRÁNSZKI, J., CARDOSO, J.C., ZENG, S. Tissue disinfection for preparation of culture. **Folia Horticulturae**, v. 28, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0008>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- DA SILVA, J.A.T., WINARTO, B., DOBRÁNSZKI, J., ZENG, S. Disinfection procedures for propagation of. **Folia Horticulturae**, v. 27, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0009>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- EL-BAKY, N.A.; AMARA, A.A.A.F. Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7110900>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- OLIVEIRA, J.P.M.; SANGLARD, N.A.; FERREIRA, A.; CLARINDO, R.C. Ploidy level, epigenetic and in vitro environment influence the indirect somatic embryogenesis of the new synthetic autoallohexaploid *Coffea*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 146, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02093-4>. Acesso em: 13 ago. 2024.
- SANGLARD, N.A., AMARAL-SILVA, P.M., SATTTLER, M.C., DE OLIVEIRA, S.C., CESÁRIO, L.M., FERREIRA, A., CARVALHO, C.R., CLARINDO, W.R. Indirect somatic embryogenesis in *Coffea* with different ploidy levels: a revisiting and updating study. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 136, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1511-9>. Acesso em: 13 ago. 2024.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetal - UFES/Alegre.