

## Ação antioxidante de extrato de cenoura e selênio no estabelecimento foliar do cafeeiro

Antioxidant action of carrot extract and selenium on coffee tree leaf establishment

Acción antioxidante del extracto de zanahoria y selenio sobre el establecimiento de hojas del cafeto

Recebido: 14/04/2024 | Revisado: 03/05/2024 | Aceitado: 07/05/2024 | Publicado: 09/05/2024

**Lurdeslaine Faria Teixeira**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7776-4436>

Universidade Federal de Lavras, Brasil

E-mail: [teixeiralurdeslaine@gmail.com](mailto:teixeiralurdeslaine@gmail.com)

**Mauro César Araújo Lopes**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2355-8020>

Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia do Sul de Minas, Brasil

E-mail: [maurolopes118@gmail.com](mailto:maurolopes118@gmail.com)

**Gleyce Maura Marques**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3585-8042>

Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia do Sul de Minas, Brasil

E-mail: [gleyceif@gmail.com](mailto:gleyceif@gmail.com)

**Priscila Pereira Botrel**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1070-3458>

Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia do Sul de Minas, Brasil

E-mail: [priscila.pereira@muz.ifsuldeminas.edu.br](mailto:priscila.pereira@muz.ifsuldeminas.edu.br)

### Resumo

A espécie *Coffea arabica* L. é de grande importância para a economia brasileira, devido o país ser o maior produtor da espécie. A embriogênese somática é uma forma de propagar a espécie, entretanto as altas taxas de contaminação e oxidação dificultam o processo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antioxidante do selenato de sódio e de diferentes concentrações do extrato de cenoura no estabelecimento foliar *in vitro* do cafeeiro. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos Vegetais do IFSULDEMINAS - Campus Muzambinho. Foram coletadas folhas de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. Posteriormente preparou-se 5 tratamentos com meios de cultura inicial para indução de calos MI, T1 (testemunha), T2 (10% v/v do extrato de cenoura), T3 (0,04 g de selenato de sódio), T4 (10% v/v do extrato de cenoura + 0,04 g selenato de sódio) e T5 (16,16% v/v do extrato de cenoura). Após 30 dias inoculados explantes, foi avaliado oxidação, contaminação fúngica e bacteriana, amarelecimento e formação de calos. As médias foram analisadas no software SISVAR, utilizando o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos 3, 4 e 5 se diferiram significativamente dos tratamentos 1 e 2, sendo que o T5 proporcionou os menores índices de oxidação dos explantes (37%). A oxidação dos tecidos diminui quando cultivados em meio de cultura suplementado com selenato de sódio, selenato de sódio + 10% v/v do extrato de cenoura e 16,16% v/v do extrato de cenoura.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*; Explante foliar; Meio de cultura alternativo; Micropropagação.

### Abstract

The species *Coffea arabica* L. is of great importance for the Brazilian economy, as the country is the largest producer of the species. Somatic embryogenesis is a way to propagate the species, however high rates of contamination and oxidation make the process difficult. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant action of sodium selenate and different concentrations of carrot extract on the *in vitro* leaf establishment of coffee trees. The experiment was conducted at the Biotechnology and Plant Tissue Culture Laboratory at IFSULDEMINAS - Campus Muzambinho. Leaves were collected from mother plants grown in a greenhouse. Subsequently, 5 treatments were prepared with initial culture media for callus induction MI, T1 (control), T2 (10% v/v of carrot extract), T3 (0.04 g of sodium selenate), T4 (10 % v/v of carrot extract + 0.04 g sodium selenate) and T5 (16.16% v/v of carrot extract). After 30 days of inoculated explants, oxidation, fungal and bacterial contamination, yellowing and callus formation were evaluated. The means were analyzed in the SISVAR software, using the Scott Knott test at 5% probability. Treatments 3, 4 and 5 differed significantly from treatments 1 and 2, with T5 providing the lowest explant oxidation rates (37%). Tissue oxidation decreases when grown in culture medium supplemented with sodium selenate, sodium selenate + 10% v/v carrot extract and 16.16% v/v carrot extract.

**Keywords:** *Coffea arabica*; Leaf explant; Alternative culture medium; Micropropagation.

## Resumen

La especie *Coffea arabica* L. es de gran importancia para la economía brasileña, ya que el país es el mayor productor de la especie. La embriogénesis somática es una forma de propagar la especie, sin embargo, las altas tasas de contaminación y oxidación dificultan el proceso. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la acción antioxidante del selenato de sodio y diferentes concentraciones de extracto de zanahoria en el establecimiento foliar in vitro de cafetos. El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales del IFSULDEMINAS - Campus Muzambinho. Las hojas se recolectaron de plantas madre cultivadas en invernadero. Posteriormente se prepararon 5 tratamientos con medios de cultivo iniciales para la inducción de callo MI, T1 (control), T2 (10 % v/v de extracto de zanahoria), T3 (0,04 g de selenato de sodio), T4 (10 % v/v de extracto de zanahoria extracto + 0,04 g de selenato de sodio) y T5 (16,16% v/v de extracto de zanahoria). Después de 30 días de explantes inoculados, se evaluó oxidación, contaminación fúngica y bacteriana, amarillamiento y formación de callos. Las medias se analizaron en el software SISVAR, utilizando la prueba de Scott Knott al 5% de probabilidad. Los tratamientos 3, 4 y 5 difirieron significativamente de los tratamientos 1 y 2, siendo el T5 el que proporcionó las tasas de oxidación de explante más bajas (37%). La oxidación del tejido disminuye cuando se cultiva en medio de cultivo suplementado con selenato de sodio, selenato de sodio + 10% v/v de extracto de zanahoria y 16,16% v/v de extracto de zanahoria.

**Palabras clave:** *Coffea arabica*; Explante de hoja; Medio de cultivo alternativo; Micropropagación.

## 1. Introdução

A espécie *Coffea arabica* L. pertence ao gênero *Coffea* localizado na família *Rubiaceae* (Davis, 2006), esta família de acordo com Fonseca et al. (2020) possui cerca de 13.765 espécies, distribuídas em 611 gêneros. No Brasil ocorre cerca de 1.406 espécies, que estão distribuídas em 126 gêneros, além disso, a família *Rubiaceae* ocupa o quarto lugar em diversidade de espécies entre as Angiospermas, além de ser cosmopolita e se concentrar principalmente nas regiões tropicais e subtropicais.

O cafeeiro é de grande importância para a economia brasileira, além disso, é o maior país produtor mundial do grão, sendo os principais estados produtores Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Paraná, Rio de Janeiro e Goiás (Conab, 2023).

Tradicionalmente o *C. arabica* é cultivado por sementes, entretanto, leva-se cerca de 30 anos para que ocorra a estabilização das características desejadas e uma nova variedade seja criada (Teixeira et al., 2004), além disso, a multiplicação do cafeeiro por estaquia não é eficiente, devido à baixa produção de ramos laterais e a dificuldade de enraizamento das estacas, sendo necessário utilizar fitohormônios de fontes externas inviabilizando a multiplicação da espécie por estaquia (Santillan et al., 2020).

Sendo assim o cultivo in vitro é uma forma de propagar em escala comercial o cafeeiro, além de ser possível produzir mudas sadias, geneticamente idênticas, uniformes, com alta qualidade sanitária, já que são cultivadas em meio asséptico e controlado (Da Silva et al., 2020). Porém, uma das dificuldades de estabelecer espécies lenhosas a partir dos explantes foliares é a oxidação, que causa a necrose dos tecidos inviabilizando o cultivo (Sato et al., 2001; Ahmad, 2013; Santos et al., 2019), além da contaminação endofítica por fungos e bactérias (Pasqualini et al., 2019; Esposito-Polesi, 2020). Assim, é necessário identificar um meio nutritivo que auxilie na diminuição da oxidação dos explantes e na contaminação, além de fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento *in vitro* da espécie.

Existem diversas formulações de meios de cultura e a composição dos nutrientes podem variar de acordo com a espécie e os objetivos que se pretende atingir, sendo necessário estudos prévios sobre as exigências nutricionais de cada espécie (Cançado et al., 2014), compostos orgânicos, como extratos vegetais, água de coco, polpa de frutas e carvão ativado tem sido adicionados nos meios de cultura tradicionais, tendo como objetivo diminuir os custos e acelerar o desenvolvimento das espécies (Nardelli et al., 2020, p. 68-69) e na diminuição da oxidação.

A cenoura (*Daucus carota*) é uma das principais olerícolas do Brasil, devido a sua importância econômica e nutricional (Parisoto & Guimarães, 2019). A espécie possui compostos bioativos e antioxidantes (Almeida et al., 2021), como os carotenoides que são pigmentos sintetizados naturalmente pelas plantas, estão presentes no interior dos plastídios, em altas

concentrações são chamados de cromoplastos, estes são responsáveis pelas cores amarela, laranja ou vermelha em frutos e flores, assim como das folhas no outono (Gonzálezpeña; Lozada-Ramírez & Ortega-Regules, 2021).

Como observado por Mezzalira e Kuhn (2021) que em seus estudos realizados com a orquídea da espécie *Phalaenopsis hibrida* cultivada *in vitro* no meio de cultura de Knudson suplementado com 10% (v/v) de suco de cenoura, demonstraram bons resultados para a germinação, além de diminuir os índices de oxidação e contaminação dos explantes.

Além disso, alguns compostos químicos como o selenato de sódio podem ser adicionados no meio de cultura, com o intuito de diminuir a oxidação dos tecidos, pois segundo Kaminagakura e Marrone (2022) o selênio possui ação antioxidante, por interagir com enzimas relacionadas com o mecanismo de defesa antioxidante (Prauchner, 2020).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antioxidante do selenato de sódio e de diferentes concentrações do extrato de cenoura no estabelecimento foliar *in vitro* do cafeeiro.

## 2. Metodologia

### 2.1 Local do experimento e preparação do extrato vegetal

O presente projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto Federal do Sul de Minas, Campus Muzambinho-MG, de Outubro a Novembro de 2022. As folhas foram coletadas no período da manhã de mudas de *Coffea arabica*, cultivar Tupi na casa de vegetação, onde elas foram cultivadas por um período de 5 meses.

Para a preparação do extrato de cenoura, foram utilizados 13,3 gramas do vegetal para cada 120 mL de água destilada. A polpa foi picada e batida em liquidificador. O extrato bruto foi colocado em um béquer, coberto com papel laminado e armazenado na geladeira por 24 horas. Para remover as partículas grandes, os extratos foram filtrados e posteriormente foi adicionado ao meio de cultura as diferentes concentrações do extrato, sendo os tratamentos T2 - 10% v/v do extrato de cenoura, T3 - 0,04 g de selenato de sódio, T4 - 10% v/v do extrato de cenoura + 0,04 g de selenato de sódio e T5 - 16,16% v/v do extrato de cenoura. Para comparação das médias foi utilizado o tratamento controle (T1 - apenas água destilada) (Figura 4).

### 2.2 Preparação do meio de cultura e procedimentos para o cultivo *in vitro* de *Coffea arabica*

As folhas foram colhidas da parte apical das mudas em casa de vegetação e levadas ao laboratório, onde elas foram lavadas em água corrente e posteriormente passaram por assepsia com algumas gotas de detergente e álcool 70% durante 1 minuto, além disso, elas foram inseridas no hipoclorito de sódio a 5% de cloro ativo por 40 minutos.

Foi preparado 1 L do meio de cultura inicial MI (Teixeira et al., 2004), sendo os sais do meio MS (Murashige & SKOOG, 1962) reduzido na metade, além disso, foi adicionado 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,4 g L<sup>-1</sup> de maltose e os reguladores de crescimento 2 microlitros de BAP, 1 microlitro de AIB e 0,04 microlitros de 2,4-D. Antes da aferição do pH foi adicionado o extrato de cenoura nos tratamentos 2, 4 e 5 e selenato de sódio nos tratamentos 3 e 4. Posteriormente o pH foi ajustado para aproximadamente  $5,7 \pm 0,1$ , solidificado com 8g de ágar e autoclavado a 1,5 atm por 20 minutos. As folhas foram lavadas três vezes com água destilada na capela de fluxo laminar (Figura 5).

Onde posteriormente os explantes foliares foram cortados em quadrados de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> em placas de Petri, sobre o papel filtro e inoculados em tubos contendo 10 mL de meio de cultura, com a face adaxial voltada para o meio. Após a inoculação, os frascos foram levados para a sala de crescimento, onde eles permaneceram na ausência de luminosidade, e com temperatura de 25°C.

### 2.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado contendo 5 tratamentos, 5 repetições, com 5 explantes foliares do cafeeiro por parcela experimental, totalizando 125 tubos.

No período de 34 dias foram realizadas quatro avaliações, sendo a primeira avaliação realizada após 15 dias da inoculação dos explantes e as outras três semanalmente, foram avaliados os índices de oxidação do tecido de acordo com a escala de avaliação (Figura 6), amarelecimento, contaminação fúngica e bacteriana, além da formação dos calos, nos diferentes tratamentos.

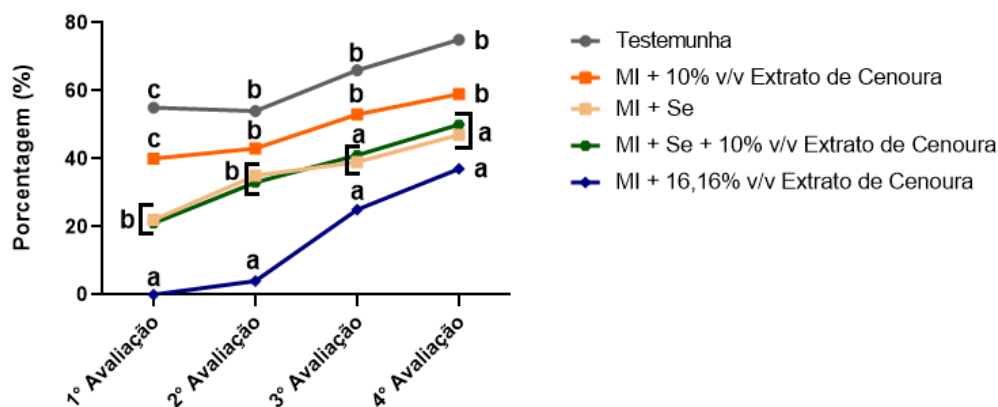
Para as comparações das médias, foi aplicado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

### 3. Resultados e Discussão

São ausentes os trabalhos dessa natureza presentes na literatura, onde foi adicionado extrato de cenoura no meio de cultura MI, tendo como principal foco estudar a atividade antioxidante deste vegetal no estabelecimento in vitro do cafeeiro, assim como a adição de selênio, entretanto, são encontrados trabalhos que demonstram a atividade antioxidante deste composto no campo, enquanto, que a cenoura está presente em trabalhos de cultivo in vitro, tendo como principal objetivo analisar o aumento da germinação, desenvolvimento e vigor das plântulas.

Como observado na Figura 1, os tratamentos apresentaram diferença significativa ao longo das quatro avaliações.

**Figura 1** - Porcentagem de oxidação dos explantes foliares do cafeeiro cultivado no meio MI com diferentes concentrações de extrato de cenoura e selênio. Muzambinho, MG, 2022.



\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.  
Fonte: Autores (2022).

Durante a primeira avaliação foi possível observar que a testemunha e o tratamento 2 (Tabela 1) não diferiram significativamente entre si (Figura 1), assim como o T3 e T4, já o T5 diferiu significativamente de todos os outros tratamentos, sendo a oxidação ausente. O T1 e T2 apresentaram respectivamente 55% e 40% de oxidação dos tecidos.

**Tabela 1** - Descrição dos tratamentos. Muzambinho, MG, 2022.

Tratamentos	Descrição do Tratamento
T1	Testemunha (água destilada)
T2	MI + 10% v/v Extrato de Cenoura
T3	MI + Se
T4	MI + 10% v/v Extrato de Cenoura + Se
T5	MI + 16,16% v/v Extrato de Cenoura

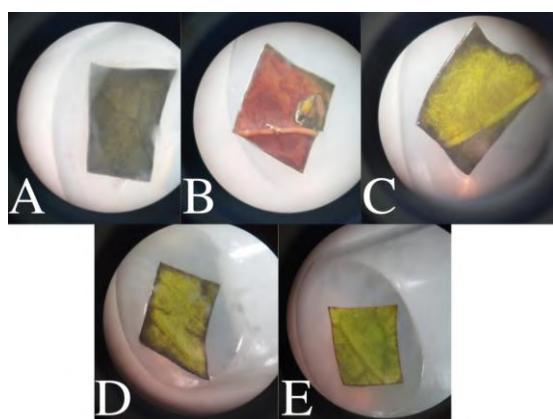
Fonte: Autores (2022).

Com base na análise estatística da segunda avaliação, apenas o T5 se diferenciou significativamente dos demais tratamentos, além disso, houve um aumento de 4% de oxidação dos tecidos desse tratamento.

Na terceira avaliação foi possível observar que houve mudança na diferença estatística somente no T3 e T4, que passaram a ser igual ao T5. Além disso, o tratamento 5 apresentou um aumento de 21% da oxidação dos tecidos.

Durante a última avaliação, a diferença significativa entre os tratamentos se manteve igual à terceira avaliação. O T3, T4 e T5 apresentou os menores índices de oxidação do tecido com o passar dos dias, quando comparado a T1 e T2, essa diferença também foi observada na morfologia dos explantes nos diferentes tratamentos, como representada na Figura 2 A e B, onde é possível observar a oxidação completa dos tecidos. Já na Figura 2 C e D verificam-se baixos índices de oxidação e na Figura 2 E é possível observar ausência de oxidação dos tecidos, pois no T5 de acordo com a análise estatística houve baixo índice de oxidação dos tecidos.

**Figura 2** - Diferença morfológica da oxidação dos tecidos: (A) Explante da testemunha totalmente oxidado; (B) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura totalmente oxidado; (C) Explante do MI + Se levemente oxidado; (D) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura levemente oxidado; (E) Explante do MI + 16,16% v/v Extrato de cenoura sem oxidação. Muzambinho, MG, 2022.



Fonte: Autores (2022).

O T5 apresentou 37% de oxidação, comparado aos outros tratamentos foi o que se obteve menores índices, além disso, o meio de cultura contendo somente selênio e o que continha selênio + 10% v/v do extrato de cenoura, apresentaram respectivamente 47,9% e 50% de oxidação, sendo a testemunha aquela que apresentou maiores índices (75%).

A testemunha apresentou altas taxas de oxidação, pois de acordo com Das e Roychoudhury (2014) o tecido vegetal quando em condições de estresse intensificam a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) e sua eliminação deve

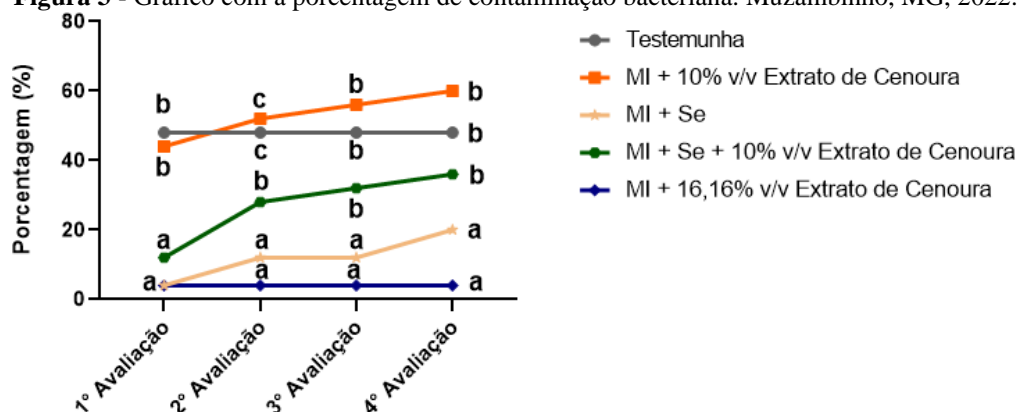
ocorrer com a aplicação de antioxidantes constantes, para evitar ou diminuir o estresse oxidativo, sendo necessário adicionar no meio de cultura substâncias antioxidantes (Welz et al., 2020). O tratamento com maior concentração de cenoura foi eficiente, pois segundo Da Silva e seus colaboradores (2015) a cenoura possui o betacaroteno, que é um pigmento fotossintetizante com ação antioxidante dos compostos fenólicos. A incisão causada nos explantes provoca um estresse oxidativo que pode causar a total oxidação dos tecidos, entretanto, os tratamentos 3 e 4 que possuíam selênio na formulação do meio de cultura apresentaram baixas taxas de oxidação, pois o selenato de sódio suaviza os danos causados na membrana celular, fortalece as defesas antioxidantes das plantas causando o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e consequentemente a diminuição da formação de EROs, assim ocorre a diminuição dos efeitos negativos causados pelo estresse oxidativo (Prauchner, 2020).

Para que ocorra com sucesso o estabelecimento *in vitro* do cafeeiro, é necessário não só superar os altos índices de oxidação, como também a incidência de contaminação bacteriana e fúngica, pois o ambiente úmido, quente e com todos os nutrientes necessários proporciona não só o desenvolvimento das plântulas, como também o de fungos e bactérias.

As plantas matrizes doadoras dos explantes foram cultivadas por um período de 5 meses em casa de vegetação, o que garante maior qualidade fitossanitária das plantas e menor taxa de contaminação dos explantes no meio de cultura. Segundo Carvalho e Silva (2012) a aquisição e manutenção das plantas utilizadas como matrizes são fundamentais para a obtenção de mudas de qualidade, além disso, o manejo e estado nutricional são importantes para a manutenção e vigor da planta fornecedora dos explantes e deve-se levar em conta o genótipo (espécie/cultivar), ambiente, estado fisiológico das plantas matrizes, como a temperatura, estresse, luminosidade, estiolamento e nutrição.

Como ilustrado na Figura 3 a testemunha e MI + 10% v/v extrato de cenoura se diferiu significativamente do MI + Se, MI + Se + 10% v/v extrato de cenoura e MI + 16,16% v/v extrato de cenoura, durante a primeira avaliação. É possível observar que o T1 e T2 apresentaram os maiores índices de contaminação por bactéria, entretanto a testemunha apresentou 48% e MI + 10% v/v extrato de cenoura 44% de contaminação bacteriana. Apesar do T3, T4 e T5 não terem se diferido significativamente, o tratamento 4 teve o maior índice de contaminação bacteriana (12%) entre eles, enquanto, que o T3 apresentou uma taxa de 4%, assim como o T5.

**Figura 3** - Gráfico com a porcentagem de contaminação bacteriana. Muzambinho, MG, 2022.



\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.  
Fonte: Autores (2022).

Durante a segunda avaliação houve um aumento da contaminação bacteriana nos tratamentos 2, 3 e 4, sendo frequente no T5 e T1, além disso, o T2 apresentou maior contaminação (52%), que o T1 (48%) apesar de não terem diferido

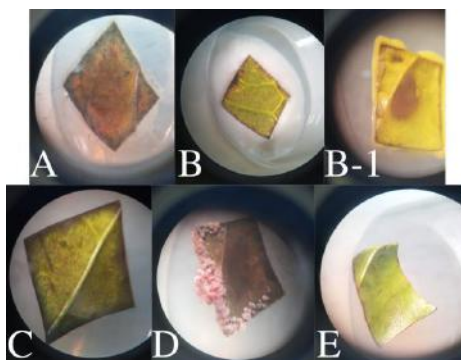
significativamente entre si. Os tratamentos T3, T4 e T5 não diferenciam significativamente entre si, porém o tratamento 4 apresentou 28% de contaminação bacteriana, sendo o maior índice entre eles.

Na terceira avaliação é possível observar na Figura 3 que o T2 e T4 apresentaram aumento dos índices de contaminação, enquanto, que o T1, T3 e T5 permaneceram frequentes. Os tratamentos 1, 2 e 4 apresentaram diferença significativa dos tratamentos 3 e 5.

É possível analisar que durante a quarta avaliação a diferença significativa foi a mesma entre os tratamentos, entretanto, houve um aumento da contaminação nos tratamentos 2, 3 e 4. Mesmo não apresentando diferença significativa dos tratamentos 1 e 4, o T2 teve a maior taxa de contaminação (60%) dentre todos os tratamentos, sendo superior à testemunha. O T3 apesar de não ter diferido do T5, apresentou 20% de contaminação, sendo superior a esse tratamento.

A contaminação observada nos tecidos está ilustrada na Figura 4, onde é possível identificar as diferenças entre os representantes de cada grupo, além disso, está presente diferentes bactérias que saem diretamente dos tecidos, como representado nas Figura 4 A, B e C, o que indica que os microrganismos presentes são endógenos dos explantes, pois segundo Cid e Teixeira (2014) mesmo realizando a assepsia dos tecidos, às vezes não é possível inibir totalmente a contaminação por ser endógena.

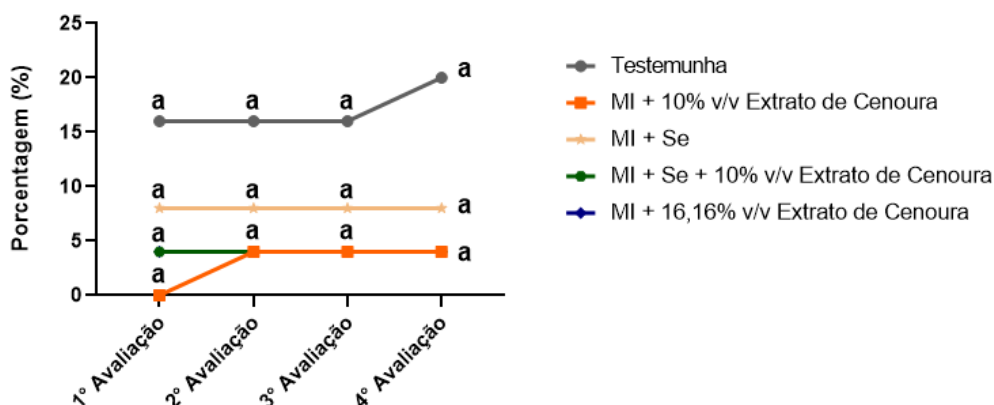
**Figura 4** - Explantes representantes da diferença significativa da contaminação bacteriana: (A) Explante da testemunha com bactéria de aparência aquosa e esbranquiçada; (B) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com presença de bactéria cremosa e esbranquiçada; (B-1) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com presença de bactéria cremosa amarela; (C) Explante do MI + Se sem contaminação; (D) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com bactéria em formato de bolinha rosa; (E) Explante do MI + 16,16% v/v Extrato de cenoura sem contaminação. Muzambinho, MG, 2022.



Fonte: Autores (2022).

Ao longo das quatro avaliações não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5) e os índices de contaminação entre eles permaneceram baixas, pois além das plantas matrizes serem cultivadas em casa de vegetação de acordo com Cid e Barrueto (2014) é necessário realizar a desinfestação dos explantes obtidos do campo ou da casa de vegetação, pois assim os contaminantes podem ser baixos, controláveis e constituídos por fungos e bactérias.

**Figura 5** - Gráfico com a porcentagem de contaminação fúngica. Muzambinho, MG, 2022.



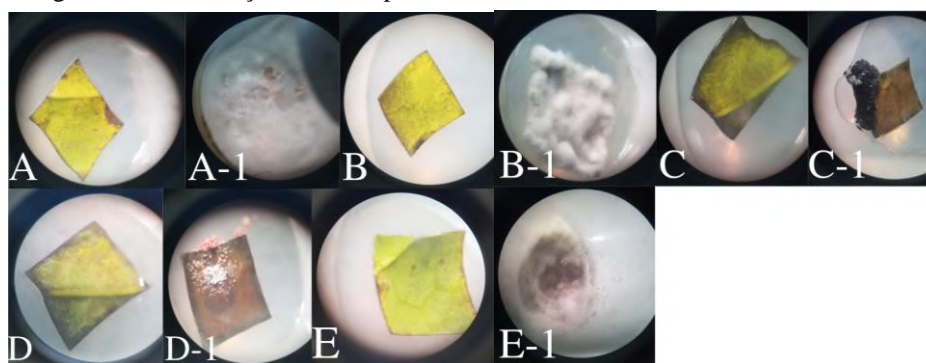
\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.  
Fonte: Autores (2022).

A testemunha apresentou o maior índice de contaminação fúngica (20%), quando comparado com os demais tratamentos. Durante a primeira avaliação é possível observar que no T2 não havia presença de fungos, sendo o menor índice, entretanto, a partir da segunda avaliação a quantidade de explantes contaminados aumentou 4%, sendo a mesma taxa apresentada pelos tratamentos 4 e 5, além disso, esse índice permaneceu frequente até a última avaliação.

Os baixos índices de fungos encontrados no meio suplementado com 16,16% v/v do extrato de cenoura pode ser explicado com base nos estudos de Hendges e Nozaki et al. (2020) pois eles observaram que o suco de cenoura junto com o BDA diminuiu a formação do crescimento micelial do fungo *Alternaria solani*, o que contribuiu com o esclarecimento das baixas contaminações que ocorrem nos meios de cultura suplementado com cenoura para o cultivo in vitro de plantas.

É possível observar na Figura 6 A, B, C, D e E a ausência dos fungos em cada tratamento, enquanto, que na figura 6 A-1, B-1, C-1, D-1 e E-1 são apresentados os diferentes fungos que se desenvolveram, tendo eles aparência de algodão (A-1; B-1 e E-1), rígida de cor preta (C-1), com poucas hifas (D-1), além de apresentar coloração branca e preto (E-1).

**Figura 6** - (A) Explante da testemunha; (A-1) Explante da testemunha de fungo com coloração branca e com aspecto de algodão; (B) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura; (B-1) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com presença de fungo com coloração branca e com aspecto de algodão, além de estar presente somente no explante; (C) Explante do MI + Se sem contaminação; (C-1) Explante do MI + Se com fungo preto com aspecto rígido; (D) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura; (D-1) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com fungos de hifas pequenas, formando estruturas pontiagudas (E) Explante do MI + 16,16% v/v Extrato de cenoura; (E-1) Explante do MI + 16,16% v/v Extrato de cenoura fungo com aspecto de algodão com coloração branca e preto. Muzambinho, MG, 2022.

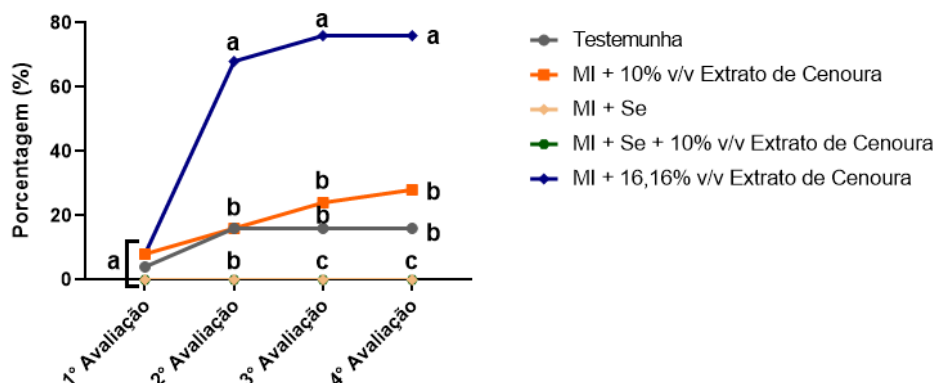


Fonte: Autores (2022).



O amarelecimento do tecido pode ser um indicativo da diferenciação celular, o que posteriormente resultará na formação de calos. A Figura 7 mostra que durante a primeira avaliação não houve diferença significativa entre os tratamentos. O T2 e T5 apresentaram o mesmo índice de amarelecimento do tecido (8%), sendo maior que os demais tratamentos, além disso, os explantes do T3 e T4 permaneceram com a coloração verde.

**Figura 7** - Gráfico com a porcentagem amarelecimento do tecido. Muzambinho, MG, 2022.



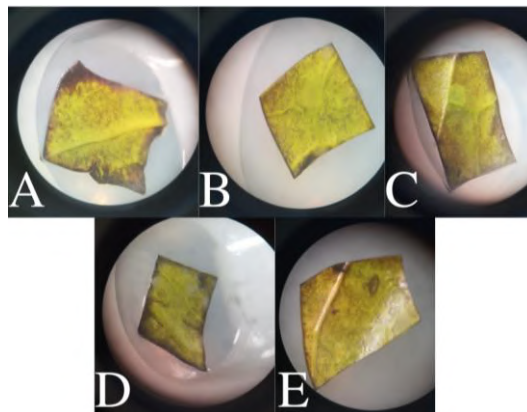
\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.  
Fonte: Autores (2022).

Na segunda avaliação os tratamentos 1, 2, 3 e 4 diferiram significativamente do tratamento 5, sendo este o que apresentou maior taxa de amarelecimento do tecido (68%), enquanto, que os dados do T1 permaneceram frequentes e o T2 teve um aumento de 8%.

Durante a terceira avaliação foi possível observar que o T5 se diferenciou significativamente de todos os tratamentos, enquanto, que o T1 e T2 não diferiram entre si, assim como o T3 e T4. Houve um aumento de 8% nos índices de amarelecimento do T2 e T5, além disso, os dados do T1, T3 e T4 permaneceram constantes.

Na quarta avaliação a diferença estatística permaneceu a mesma. O T5 apresentou maior índice de amarelecimento e permaneceu o mesmo. Apesar do T1 e T2 não terem diferido entre si, o tratamento 2 teve uma porcentagem maior (28%) que o T1 (16%). Os tratamentos 3 e 4 não apresentaram amarelecimento do tecido até o fim da avaliação, sendo possível observar na Figura 8 C e D que o tecido permaneceu esverdeado, além disso, é possível identificar na Figura 8 E o tecido totalmente amarelado, enquanto, que nas imagens 8 A e B eles estão esverdeados amarelados.

**Figura 8** - Explantes representantes da diferença significativa: (A) Explante da testemunha; (A-1) Explante da testemunha com coloração verde amarelado; (B) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura verde amarelado; (C) Explante do MI + Se tecido verde; (D) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura tecido verde; (E) Explante do MI + 16,16% v/v Extrato de cenoura totalmente amarelo. Muzambinho, MG, 2022.

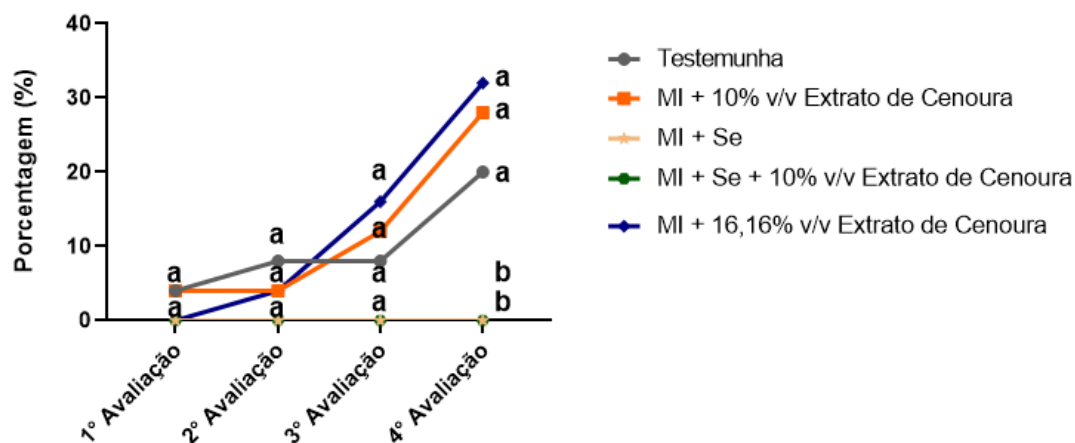


Fonte: Autores (2022).

A calogênese é uma fase da embriogênese somática indireta, nesta ocorre a formação de calos que são induzidos pela auxina e citocinina, além disso, a embriogênese somática indireta possui alta produção de embriões, entretanto, é um processo muito lento (Almeida, 2018).

É possível observar na Figura 9 que na primeira avaliação da formação de calos não houve diferença significativa entre os tratamentos, assim como na segunda e terceira avaliação.

**Figura 9** - Gráfico da formação de calos. Muzambinho, MG, 2022.



\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si entre os tratamentos pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Autores (2022).

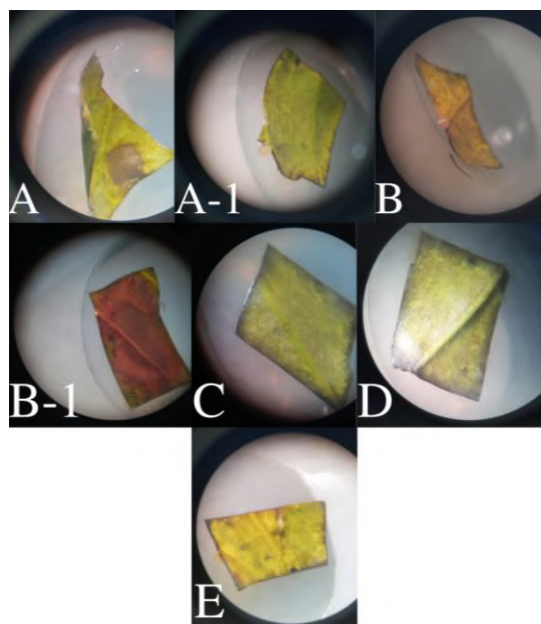
Durante a primeira avaliação é possível observar que não houve desenvolvimento de calos, enquanto, que o T1 e T2, apresentaram 4% de tecidos com calos.

Na segunda avaliação o índice de formação de calos foi de 8% na testemunha, além de ocorrer aumento de 4% no tratamento 5, permanecendo frequente nos demais tratamentos. Enquanto, que na terceira avaliação a formação de calos aumentou no T2 (12%) e T5 (16%), permanecendo frequente no T1, T3 e T4.

É possível observar que na quarta avaliação os tratamentos 1, 2 e 5 se diferiram significativamente dos tratamentos 3 e 4, sendo que nestes não houve formação de calos. O T2 e T5 apresentou os maiores índices de formação de calos, sendo respectivamente 28% e 32%, os dados obtidos são corroborados pelos estudos de Pachooa e Ramburn (2004) que identificaram a presença do ácido indol-3-acético (AIA) no suco de cenoura, além disso, eles observaram que calos de *Daucus carota* cultivados em meio de cultura MS suplementado com as concentrações de 20% e 70% do extrato de cenoura sem reguladores de crescimento induziu a formação de calos e aumentou o peso fresco dos calos o dado obtido é corroborado. O T1 apresentou 20% de formação de calos, sendo esse o menor índice de formação de calos. No cultivo in vitro do açafraão Halim e seus colaboradores (2018) observou que quando se adiciona extrato de cenoura no meio MS basal não ocorre a formação de calos, enquanto que Manawadu, Dahanayake e Senanayake (2014) identificaram a formação de calos no meio de cultura MS com a presença de reguladores de crescimento ANA e BAP, além de 10% de cenoura e abóbora moída, não houve formação de brotos.

Morfologicamente foi possível observar, que os tecidos dos tratamentos 3 e 4 permaneceram com a coloração verde (Figura 10 C e D), enquanto, que no T1 apresentou tecido verde e pouco amarelado (Figura 10 A), além dos calos terem se desenvolvido nas nervuras da folha (Figura 10 A-1) e nas bordas, os explantes do T2 e T5 eram amarelos e os calos aparecem nas nervuras (Figura 10 B e E) e cortes (Figura 10 E), ademais calos também se formaram em tecidos oxidados, como observado na Figura 10 B-1.

**Figura 10** - Explantes representantes da diferença significativa: (A) Formação de calos nos explantes da testemunha; (A-1) Formação de calos na nervura da folha (B) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com formação inicial de calos na nervura; (B-1) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura com formação inicial de calos no tecido oxidado (C) Explante do MI + Se sem formação de calos; (D) Explante do MI + 10% v/v Extrato de cenoura sem formação de calos; (E) Explante do MI + 16,16% v/v Extrato de cenoura com formação inicial de calos na nervura da face adaxial e no corte. Muzambinho, MG, 2022.

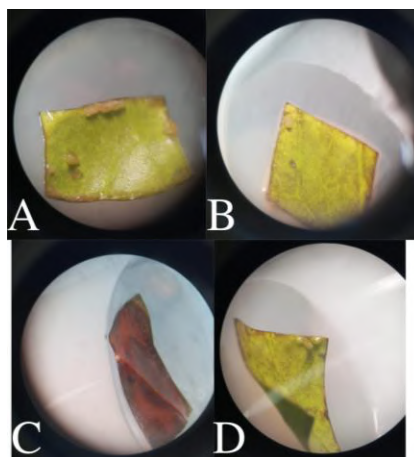


Fonte: Autores (2022).

A formação de calos é uma fase importante na embriogênese somática indireta, onde as células a partir do equilíbrio hormonal entre a auxina e a citocinina irão estimular a divisão celular, fazendo com que ocorra o aparecimento de um

aglomerado de células indiferenciadas, além disso, esses calos podem apresentar diferentes cores. Os calos desenvolvidos no presente experimento apresentaram coloração amarelo (Figura 11 A), creme (Figura 11 B), marrom (Figura 11 C) e verde (Figura 11 D), resultados semelhantes foram observados por Bartos e seus colaboradores (2011) onde foi identificado calos levemente amarelados a creme, esbranquiçados e amarelo intenso, compactos ou friáveis e aquosos.

**Figura 11** - (A) Calos com coloração amarela; (B) Calos esbranquiçados; (C) Calos com coloração marrom; (D) Calos esverdeados. Muzambinho, MG, 2022.



Fonte: Autores (2022).

Além disso, Pachooa e Ramburn (2004) também encontrou calos na coloração verde e creme quando cultivados em meio de cultura suplementado com extrato de cenoura.

#### 4. Conclusão

Conclui-se que a oxidação dos tecidos diminui quando cultivados em meio suplementado com 0,04 g de selenato de sódio, 10% v/v do extrato de cenoura + 0,04 g de selênio e 16,16% v/v do extrato de cenoura.

A concentração de 16,16% v/v de extrato de cenoura acrescido no meio de cultura promove maior índice de amarelecimento dos explantes, enquanto, que a presença de Se retarda ou inibe o desenvolvimento de calos e amarelecimento dos tecidos.

O manejo das plantas matrizes é um fator importante para a diminuição da contaminação fúngica e bacteriana, além disso, estudos precisam ser realizados para verificar a ação bactericida do Selenato de Sódio e do extrato de cenoura.

#### Referências

- Ahmad, I. et al. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 13(4), 539-547.
- Almeida, A. C. M. et al. (2021). *Avaliação fitoquímica de resíduos de uma indústria de sucos*. ENEIS.
- Almeida, J. A. S. (2020). Observations on Somatic Embryogenesis in *Coffea arabica* L. In: Araujo-Júnior, C. F. et al. *Coffee-Production and Research*. London: IntechOpen, 3-22.
- Bartos, P. M. C. et al. (2011). Histologia de calos provenientes da embriogênese somática de *Coffea arabica* L. In: *VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, Araxá.
- Cançado, G. M. de A et al. (2014). Cultivo de plantas in vitro e suas aplicações. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 30(253), 64-74.
- Cid, L. P. B. (2014). *Cultivo in vitro de plantas*. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014.

- Conab. (2016). Acompanhamento da safra brasileira. [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe/item/download/47548\\_53fa2722364e222598e51dcb5f8f0ede](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe/item/download/47548_53fa2722364e222598e51dcb5f8f0ede).
- Da Silva, C. P. et al. (2020). Reguladores vegetais no crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas in vitro. *Agricultura* 4,0, 51.
- Da Silva, E. B. et al. (2015) Capacidade antioxidante de frutas e hortaliças. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 10(5), 93-98.
- Das, K.; & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>.
- Davis, A. P. et al. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), 465-512. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>.
- Esposito-Polesi, N. P. (2020). Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo in vitro de plantas. *Rodriguésia*, 71. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071072>.
- Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. *Ciência e agrotecnologia*, 35, 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.
- Fonseca, W. O.; Zappi, D.; Jardim, J.; & Aona, L. Y. S. (2020) A família Rubiaceae no Parque Nacional de Boa Nova, Estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, 47, 1-47. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-46/2019>.
- González-Peña, M. A.; Lozada-Ramírez, J. D.; & Ortega-Regules, A. E. (2021) Carotenoids from mamey (*Pouteria sapota*) and carrot (*Daucus carota*) increase the oxidative stress resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and biophysics reports*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100989>.
- Halim, R.; Akyol, B.; Gurel, A.; & Bayraktar, M. (2018). In vitro callus induction of saffron (*Crocus sativus* L.). *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(11), 1-5.
- Hendges, C.; & Nozaki, M. H. (2017). Desenvolvimento de *Alternaria solani* sobre diferentes meios de cultura, fotoperíodo e temperatura. *Colloquium Agrariae*, 13(1), 16-24, 2017.
- Kaminagakura, C. L. N.; & Marrone, L. (2022). Efeitos da suplementação de selênio em indivíduos com Tireoidite de Hashimoto. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa*, 38, 87-107.
- Manawadu, I.; Dahanayake, N.; & Senanayake, S. G. N. (2014). Effects of diferente natural organic additives on in vitro shoot regeneration of *Raphanus sativus* L. var. Beeralu. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4(3A), 219-223.
- Mezzalira, F. K.; & Kuhn, B. C. (2020) Uso de ferramentas da bioinformática para determinação dos possíveis efeitos do  $\beta$ -caroteno no cultivo in vitro de *Phalaenopsis*. *Colloquium Agrariae*, 16(2), 101-113.
- Mezzalira, F. K.; & Kuhn, B. C. (2021). Padronização de um protocolo para assepsia de segmentos nodais de *Phalaenopsis* para clonagem in vitro. *Colloquium Agrariae*, 17(1), 10-17.
- Murashige, T.; & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), p. 473-497.
- Nardelli, M. S et al. (2020). Desenvolvimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* gardner em diferentes meios de cultura. *Journal of Agronomic Sciences*, 9(1), 61-72.
- Pachooa, D.; & Ramburn, R. A. (2004). study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*. *African Journal of Biotechnology*, 3(4), 248-252.
- Parisoto, G. J.; Guimarães, V. & Di A. (2019). Estudo de caso e análise dos preços da cenoura no estado do Paraná. *Sober*, Ilhéus, 2019.
- Pasqualini, A. P. de A. et al. (2019). Cultura in vitro e diversidade de fungos endofíticos em *Bambusa oldhamii*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49.
- Prauchner, C. A. (2020). *A importância do selênio para a agropecuária e saúde humana*. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciencia: Editora UFSM.
- Santos, J. dos et al. (2019). Estabelecimento in vitro de oliveira 'Arbequina' e 'Koroneiki'. *Ciência Florestal*, 29, 508-518. <https://doi.org/10.5902/1980509831305>.
- Santillan, T. S. et al. (2020). Efecto del área foliar y bioestimulantes en la propagación vegetativa de café especial (*Coffea arabica* L. var. *typica*) en cámara de subirrigación. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 4(3), 1-7. <https://doi.org/10.25127/aps.20203.663>.
- Sato, A. Y. et al. (2001). Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. *Cerne*, 7(2), 117-23.
- Teixeira, J. B. et al. (2004). *Multiplificação clonal de café (Coffea arabica L.) via embriogênese somática*. EMBRAPA: Brasília.
- Teixeira, L. J. et al. (2011). Cenoura (*Dacus carota*): processamento e composição química. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12).
- Welz, V. F. F. et al. (2020). Crescimento, atividade enzimática e antioxidante de manjeriço cultivado in vitro. *Revista Caatinga*, 33, 660-670. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n309rc>