

Alelopatia Entre Café (*Coffea arabica*) e Milho (*Zea mays*) Via Micropropagação *In Vitro*

Marcelo Ferri Gonçalves¹; Larissa Pereira Marques de Almeida¹; Maria Gessi Teixeira²
e Wellington Marota Barbosa²

¹Instituto Federal do Sul de Minas – Campus Machado, Machado, MG, Bolsista Fomento Interno; ²Instituto Federal do Sul de Minas – Machado, Machado, MG, wmbarbosa@hotmail.com

Introdução

Alelopatia são interações bioquímicas entre organismos de uma mesma comunidade, onde a interferência entre plantas se processa por meio de compostos (aleloquímicos) auto elaborados e liberados no ambiente por seus tecidos vivos ou pela decomposição de tecidos mortos (RICE, 1984; ALMEIDA, 1991; LORENZI, 2000).

Os aleloquímicos podem atuar em processos relacionados ao crescimento (divisão celular, sínteses orgânicas, interações com hormônios, efeitos na síntese ou atividade de enzimas); ao metabolismo respiratório; à fotossíntese (movimento estomático, conteúdo de clorofila, área foliar, fotofosforilação, atividade de ATPase da membrana do cloroplasto) e à absorção de nutrientes (acúmulo mineral, absorção de íons, efeitos nas membranas e nas relações hídricas) (DURIGAN e ALMEIDA, 1993). É importante lembrar que os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um dado composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo da concentração do mesmo no meio ambiente (RICE, 1984).

A cultura do cafeeiro, plantada sobre restos ou consorciada com a cultura do milho (*Zea mays*), pode sofrer interferências devido aos efeitos alelopáticos, provavelmente pela existência de um composto chamado 2-benzoxazolinona (BOA) (FRANÇA, 2007), que provoca danos nas células, e a enzima benzoxazinone glicosidase, que promove a hidrólise do glicosídeo (NAIR et al., 1990). Uma maneira de avaliar o modo de ação de um aleloquímico específico é por meio do monitoramento do efeito deste sobre as principais funções das plantas. As pesquisas têm permitido concluir que os aleloquímicos interferem em processos metabólicos primários no sistema de crescimento das plantas.

Dentre os tipos de técnicas biotecnológicas, a micropropagação de plantas *in vitro* é a mais antiga aplicada ao melhoramento de plantas, e a sua importância em algumas espécies é indiscutível (CARVALHO, 2008). A cultura de tecidos (CT) consiste em cultivar tecidos

vegetais (explantes) em meio altamente controlado (nutrientes e reguladores de crescimento) e asséptico, mantendo condições controladas de luminosidade e temperatura.

Os métodos de CT permitem a produção de plantas relativamente uniformes em grande escala, em menores períodos de tempo em relação aos métodos convencionais. Em cafeeiro, os estudos com CT foram iniciados por Staritsky (1970), através da indução de embriões somáticos a partir de internódios de *Coffea canephora*. Atualmente três diferentes métodos podem ser usados: microestacas, embriogênese somática direta ou embriogênese indireta (SÖNDAHL, 1985).

Matiello et al. (2005) recomendam a utilização do milho como cultura intercalar, salientando sua importância como proteção contra ventos em lavouras jovens, como renda extra e por fornecer palhada (matéria orgânica) ao solo.

O efeito inibitório de palhada do milho no desenvolvimento das mudas recém-transplantadas é dependente do genótipo do milho, podendo estimular ou reduzir o desenvolvimento do cafeeiro. A implantação da cultura de café em áreas plantadas com milho em anos anteriores tem mostrado efeitos negativos sobre o desenvolvimento das mudas transplantadas, provavelmente devido aos aleloquímicos do milho deixados no solo (SANTOS et al., 2003; ALVES, 2003; FRANCA et al., 2007).

Foi proposto o desenvolvimento de técnicas laboratoriais de CT vegetais que possam auxiliar na identificação dos efeitos aleloquímicos entre os diferentes cultivares de milho e de café, uma vez que a identificação em campo poderia acontecer numa cultura perene, somente após 1 a 2 anos de plantio.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus* Machado. Extratos aquosos de diferentes partes do milho foram adicionados ao meio de cultura para micropropagação do cafeeiro.

Obtenção de extratos aquosos

A técnica utilizada foi a de extração a frio preconizada por Barnes et al. (1987). Amostras de matéria fresca do material vegetal de milho (50 g da cultivar AG-1051) foram colocadas em estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 55°C até a obtenção de peso constante, padronizado em 7 g para cada amostra. Posteriormente, cada amostra foi imersa em água destilada até a cobertura das folhas e deixada em repouso sob temperatura

ambiente (20 °C) durante 24 h. Os extratos foram obtidos por filtração em papel tipo Whatman 2 e a parte sólida foi descartada (ALVES, 2007). O volume do extrato previamente filtrado foi aferido para 100 mL em cada tratamento e adicionado ao meio de cultura. O volume do extrato aquoso representou 40% do meio.

Micropropagação *in vitro*

Folhas recém expandidas do cultivar Catuaí 15, cultivadas em vasos de 18 litros, mantidas na casa de vegetação, oriunda do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado, foram coletadas como fontes de explantes para indução da calogênese e da embriogênese somática. O controle fitossanitário das plantas foi realizado sete dias antes com fungicida da classe dos triazóis (Priori Xtra), e 48 horas antes com fungicida da classe das estrobilurinas (Amistar) a fim de controlar a infecção por fungos, sendo as dosagens utilizadas conforme recomendação do fabricante. As folhas foram coletadas no início da manhã, conduzidas ao laboratório, onde foram lavadas para retirar resíduo e contaminação existente na epiderme. Após este processo foram levadas para câmara de fluxo laminar e submetidas à desinfestação superficial com álcool etílico a 70% por um minuto. Em seguida, foram tratadas com hipoclorito de cálcio a 4% contendo Tween 20 0,04% (v/v) por 10 minutos. Novamente as folhas foram introduzidas em álcool etílico a 70% por 1 minuto e tratadas com hipoclorito de sódio a 2,4% contendo Tween 20 0,04% (v/v) por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes em água deionizada autoclavada e cortados explantes com cerca de 7 x 7 mm, excluindo-se a nervura central, sendo então inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura (SÖNDAHL et al., 1985).

Após a desinfestação, os explantes foram cultivados em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 x 15 mm de diâmetro) contendo 25 a 30 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de vitaminas de Gamborg, cisteína 0,272 mM, BAP 5,0 µM, 2,4-D 10 µM, Phytigel[®] 2,6 mgL⁻¹. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 1,1 atm de pressão. O pH foi ajustado para 5,7, anteriormente à autoclavagem. As placas continham sete explantes em cada, sendo mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D, a 25 °C com fotoperíodo de 16 horas de escuro.

Os tratamentos foram: T1: testemunha sem a adição de extrato aquoso; T2: extrato da Raiz; T3: extrato do caule; T4: extrato da folha; T5: extrato da flor; T6: extrato do fruto.

A avaliação foi realizada no 25º dia, utilizando lupa estereoscópica para contagem do número e o tipo de calo em desenvolvimento como descrito por Barbosa (2003).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 10 repetições por tratamento.

Resultados e Discussão

As plantas apresentaram o início da calogênese ao sexto dia após inoculação dos explantes. O primeiro tratamento a apresentar o aparecimento de calos foi o tratamento que possuía a adição de extrato aquoso do fruto do milho, sugerindo a presença de substância que induziu a aceleração na formação de calos.

No 25º dia foi possível observar a presença de calos cicatriciais, nodulares e calos mistos. Não foi observada formação de embriões, sendo que o surgimento desses só foi constatado por Barbosa (2003) aos 114 dias após a inoculação.

Tabela 1: Porcentagem de explantes foliares de café arábica, cultivar Catuaí 15 com presença de calos.

Tratamentos	% de explantes com calogênese
Testemunha	100
Raiz	94,28
Caule	93,61
Folha	28,57
Flor	9,09
Fruto	93,61

Tabela 2: Número médio de calos por explante foliar de café em função de diferentes extratos aquosos de milho.

Tratamentos	Médias
Testemunha	14,829 a
Fruto	9,041 b
Raiz	7,436 b
Caule	6,958 b
Folha	0,854 c
Flor	0,084 c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os tratamentos que apresentaram menor frequência calogênica (28,57% para folha e 9,09% para flor) e menor média de explantes com calos (0,85 para folha e 0,084 para flor) podem ser observados nas tabelas 1 e 2. Explantes cultivados em meio contendo extrato de Folha (Figura 1C) e Flor (D) apresentaram menores níveis de calogênese. Os tratamentos Raiz (E), Caule (B) e Fruto (F) apresentaram redução na frequência calogênica e na média de calos por explantes se comparados com a testemunha (Figura 1A), porém um nível maior se comparados aos tratamentos contendo extratos da folha e do fruto. Isso nos mostra que a substância alelopática encontrada no milho apresenta maior concentração nestes tecidos.

Apesar dos altos níveis de oxidação em alguns explantes, não ocorreu a inibição da formação de calos.

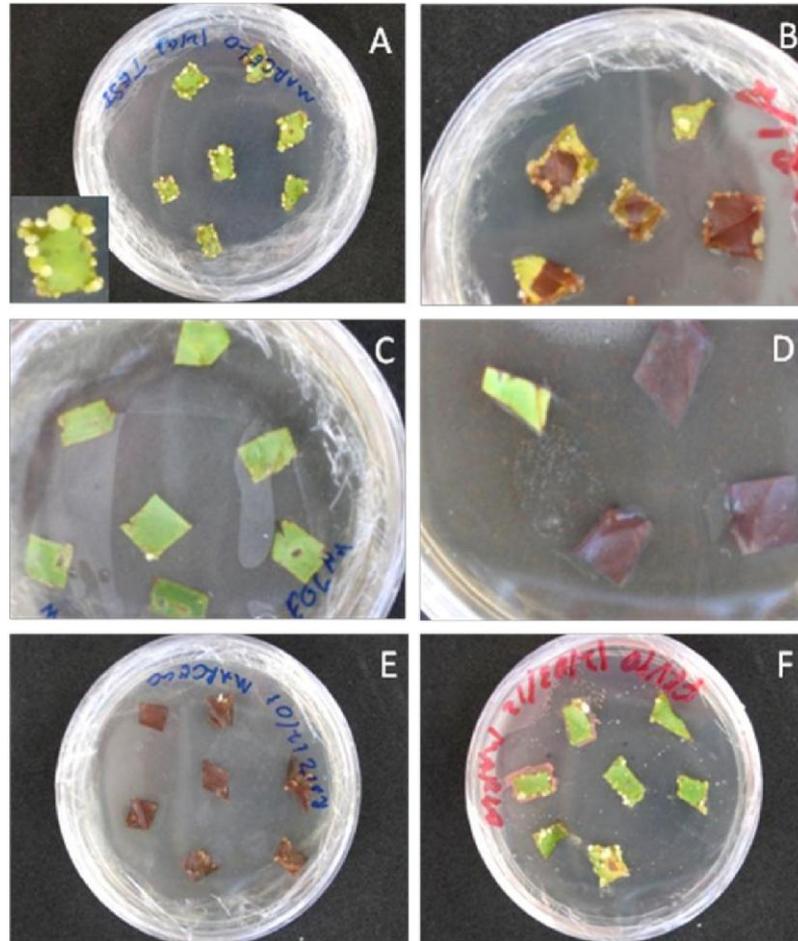


Figura 1: Explantes foliares de café arábica inoculados em meio de cultura sem extrato aquoso (A). Explantes inoculados em meio de cultura com a adição de extrato aquoso oriundo do caule do milho (B); folha (C); Flor (D); Raiz (E) e Fruto (F).

Conclusões

Com os resultados desse trabalho, pode-se concluir que:

Todos os órgãos da cultura do milho possuem substâncias alelopáticas com a cultivar de Catuaí 15 quando cultivados por meio de cultura de tecidos;

Os extratos aquosos da flor e folha do milho proporcionaram maior inibição à calogênese em explantes foliares de café.

Agradecimentos

Ao *campus* Machado do IFSULDEMINAS pelo fornecimento de bolsas e auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, C.V., ANDREOTE, F.D., YARA, R., TANAKA, F.A.O., AZEVEDO, J.L.;
ALMEIDA, M. 2009. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts.
World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1757-1764.
- ALMEIDA, F. S. **Controle de plantas daninhas em plantio direto**. Londrina: IAPAR, 1991. 34 p. (IAPAR – Circular Técnica, n. 67).
- BARBOSA, W.M. **Embriogênese somática em cafés arábica e robusta**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado. 2003.
- CARVALHO, C.H.S., et al. **Cultivares de Café: origem, características e recomendações**. 1ª ed. – Brasília: Embrapa Café, 2008.
- DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. L. S. **Noções sobre alelopatia**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 28 p.
- FRANÇA, A.C. et al. Efeitos de Restos culturais de milho no desenvolvimento inicial de cafeeiros. **Scientia Agraria**. Curitiba, v.8, n.3, p.247-258, 2007.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 383 p.
- MATIELLO, J.B. et al. **Cultura de café no Brasil. Novo Manual de Recomendações**. Rio de Janeiro – RJ e Varginha – MG: 2 ed. MAPA/PROCAFÉ, 2005.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAIR, M.G. et al. 2,2'-oxo-1,1'-azobenzene a microbially transformed allelochemical from 2,3-benzoxazolinone. **Journal of Chemical Ecology**. New York, v. 16, n. 2, p. 353-364, 1990.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. Orlando: Academic, 1984. 422 p.
- SANTOS, C.C.; SOUZA, I.F.; ALVES, L.W.R. Efeitos de restos culturais de milho sobre o crescimento de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.5, p.991-1001, 2003.
- SÖNDAHL, M. R., NAKAMURA, T., SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R., HUGHES, K. W., CONSTANTIN, M. P., HOLLAENDER, A. (Eds.), **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 215 – 232.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta Botanica Neerlandica**. v. 19, p. 509-514, 1970.