

USO DE *PLANT PRESERVATIVE MIXTURE* NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTE FOLIARES DE CAFÉ ROBUSTA

Ronan A. MARQUES¹; Wellington M. BARBOSA²; Maria G. TEIXEIRA³; Maria L.L. BRAGION⁴

RESUMO

Um dos maiores entraves na micropropagação de uma espécie é o seu estabelecimento *in vitro*, devido à dificuldade de obter tecidos livres de contaminação por bactérias e fungos. O uso de biocidas como o PPM pode minimizar este problema. Com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de contaminação e a possibilidade de fitotoxidez aos explantes foliares de café adicionando o PPM ao meio de cultura. Foram adicionados ao meio de cultura doses de 0,15; 0,375; 0,75 e 1,5 mL.L⁻¹. Conclui-se que a adição de PPM no cultivo *in vitro* de explantes foliares de café robusta não apresenta resultados significativos no controle da contaminação, porém reduz a velocidade da infestação e não interfere na calogênese.

Palavras-chave: Contaminação *in vitro*; *Coffea canephora*; Micropropagação.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas de propagação *in vitro* de cafeeiros poderia promover uma alternativa viável para a rápida multiplicação de novas plantas, novos clones, híbridos, variantes somaclonais ou plantas transgênicas, com características desejáveis e representadas por um número pequeno de espécimes (SÖNDAHL et al., 1985).

Na micropropagação de uma espécie, o primeiro passo é o seu estabelecimento *in vitro*. No entanto, um dos maiores entraves no seu estabelecimento está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação por bactérias e fungos. Mesmo após a realização da desinfestação dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena permanecem no material (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O uso de biocidas industrializados pode minimizar o problema de contaminação com microrganismos no cultivo *in vitro*. Um desses biocidas é o *Plant Preservative Mixture* (PPMTM), pertencente a classe das isoatiazolonas que é utilizado profilaticamente sob forma de mistura de conservante de plantas (NIEDZ e BAUSHER, 2002).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de contaminação dos explantes foliares de café do genótipo Apoatã IAC 2258, adicionando o PPMTM ao meio de cultura, e também avaliar a possibilidade de fitotoxidez do mesmo à formação de calos nos explantes foliares de café.

¹Bolsista, Fomento Interno, IFSULDEMINAS – Campus Machado. E-mail: ronan_am@outlook.com

²Orientador, IFSULDEMINAS – Campus Machado. E-mail: wmbarbosa@hotmail.com

³Colaborador, IFSULDEMINAS – Campus Machado. E-mail: maria.teixeira@ifsuldeminas.edu.br

⁴Colaborador, IFSULDEMINAS – Campus Machado. E-mail: lima.bragion@ifsuldeminas.edu.br

2. MATERIAL E MÉTODOS

Folhas do genótipo Apoatã IAC 2258, mantidas em casa de vegetação, foram coletadas como fonte de explantes. Em seguida foi feita a desinfestação padrão para cultivo *in vitro*, utilizando álcool 70 °GL e hipoclorito de sódio. A folha foi cortada em segmentos com cerca de 7 x 7 mm, sendo excluída a nervura central e as margens. Os segmentos foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura em placas de Petri de poliestireno cristal estéreis (90 x 15 mm de diâmetro) contendo 25 a 30 mL do meio de cultura. Foram dez explantes por placa. As culturas permaneceram no escuro por 30 dias, a 25 °C, e posteriormente recultivadas.

O meio de cultura utilizado para a indução calogênica foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 5 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento BAP, sacarose à 3%, 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de *Phytigel*. Após 30 dias as culturas foram recultivadas em meio de cultura secundário com mesma composição, com exceção da dosagem do 2,4-D que sofreu redução para 1 mg.L⁻¹. Foram feitos 4 tratamentos adicionando PPMTM ao meio de cultura nas doses de 0,15; 0,375; 0,75; 1,5 mL.L⁻¹ e um controle sem a adição do biocida. O delineamento foi inteiramente casualizados, com 5 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri com 10 explantes.

Aos 7 dias e 70 dias de cultivo foram avaliadas as porcentagens de contaminação dos explantes. Aos 70 dias de cultivo também avaliou-se a formação e o tipo de calo, e se houve toxidez devido ao biocida adicionado ao meio. Para avaliar o índice da velocidade de contaminação calculou-se o $IVC = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_n}{N_n}$, onde C₁, C₂, C_n = número de explantes contaminados na primeira, segunda, *n* contagens, e N₁, N₂, N_n = número de dias de cultivo à primeira, segunda, *N* contagens.

Os resultados obtidos foram transformados (X^{1/2}) e submetidos a análise de variância, sendo as médias avaliadas pelo teste de Scott-Knott, com 5 % de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar uma tendência favorável a formação de calos na dose 0,375 mL.L⁻¹ com 55% de calos cicatriciais e 6% calos nodulares em relação a testemunha. Entretanto à medida em que se aumentou a dose de PPMTM a porcentagem de calos tendeu a diminuir (FIGURA 1).

O uso do PPMTM pode favorecer, prejudicar ou não interferir no crescimento *in vitro*, sendo que esta influência deve ser avaliada para cada espécie (CORREA; QUISEN, 2010; RIHAN et al., 2012; FERREIRA et al., 2012).

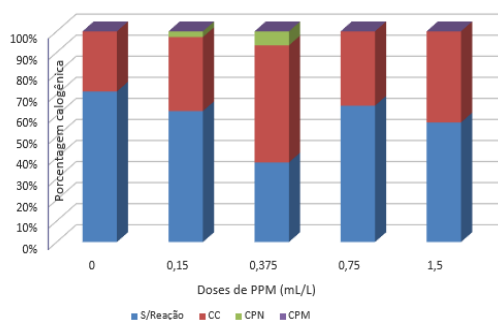


FIGURA 1: Reação calogênica em explantes foliares de café robusta cultivados *in vitro* com doses de 0; 0,15; 0,375; 0,75 e 1,5 mL.L⁻¹ de PPMTM. S/Reação: Sem Reação; CC: Calo Cicatricial; CPN: Calo Primário Nodular; CPM: Calo Primário Misto.

Quanto à contenção da contaminação dos explantes foliares de café, as doses utilizadas de PPMTM não diferiram estatisticamente do controle ($F > 5\%$), tanto na primeira avaliação com 7 dias quanto na avaliação com 70 dias após o cultivo. Entretanto, em valores absolutos, é possível observar na última avaliação que o controle apresentou um maior índice de contaminação em relação a doses de PPMTM com 46% de contaminação, podendo indicar uma redução percentual na contenção da contaminação *in vitro* (FIGURA 2). Essa tendência já foi comprovada por Duarte (2016), onde relatou a eficiência do controle de contaminação do cultivo *in vitro* de bambu utilizando o PPMTM. Resultado similar foi encontrado por Ferreira et al., (2012), onde adicionaram o biocida ao meio de cultura no cultivo *in vitro* de pitangueira e, na dose de 0,250 mL.L⁻¹, não apresentou contaminações significativas.

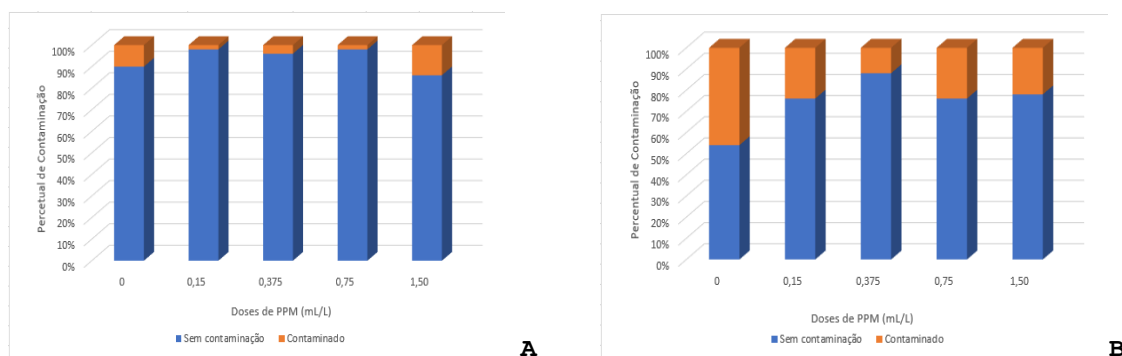


FIGURA 2: Porcentagem de contaminação em explantes foliares de café robusta cultivadas *in vitro* com diferentes doses de PPM. A: 7 dias de cultivo; B: 70 dias de cultivo.

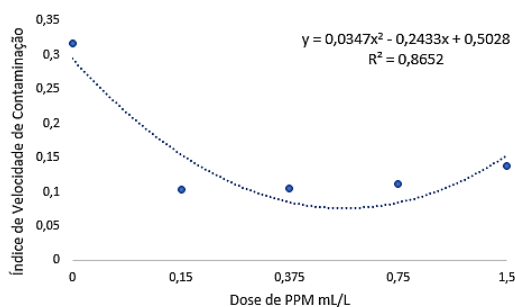


FIGURA 3: Índice de velocidade de contaminação em explantes foliares de café robusta cultivadas *in vitro* com diferentes doses de PPM após 70 dias de cultivo.

Analisando a velocidade de contaminação dos explantes foliares, observou-se maior índice de velocidade de contaminação no controle em relação às doses de PPMTM, ou seja, a contaminação no tratamento sem o biocida se espalhou mais rapidamente (FIGURA3).

4. CONCLUSÕES

A adição de PPM no cultivo *in vitro* de explantes foliares de café robusta não resultou em controle significativo da contaminação, porém reduziu a velocidade da mesma e não interferiu na calogênese.

REFERÊNCIAS

CORREA, M. L.; QUISEN, R. C. Estabelecimento *in vitro* e calogênese de espécies perenes tropicais de interesse econômico. In: Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo. JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 2010, Manaus. **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010. p. 93-99.

DUARTE, M. A. Uso de vácuo infiltração com *Plant Preservative Mixture* (PPM) no cultivo *in vitro* dos bambus *Dendrocalamus asper* e *Guadua angustifolia* a partir de matrizes sob diferentes sistemas de cultivo, Florianópolis, 2016. Disponível em:

<[https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/174352/TCC-](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/174352/TCC-MARIA%20ANTONIA%20DUARTE.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

MARIA%20ANTONIA%20DUARTE.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 06 ago. 2018.

FERREIRA, L. V.; COSTA, R. R.; CARVALHO, S. F.; DUTRA, L. F.; ANTUNES, L. E. C. PPM como descontaminante no meio de cultura para pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). In: Embrapa Clima Temperado-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO. ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2012, Pelotas. **Palestras e resumos...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 231 p. Organizadores: Marcia Vizzotto, Carlos Reisser Júnior, Rosa Lia Barbieri, Rodrigo Cezar Franzon.

GAMBORG, O. L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p. 183-260, 1998.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NIEDZ, R.; BAUSHER, M. G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.

RIHAN, H. Z.; AL-ISSAWI, M.; AL-SWEDI, F.; FULLER, M. P. The effect of using PPM (Plant Preservative Mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. **Scientia Horticulturae**, Plymouth, v.141, p.47-52, 2012.

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, p. 215 – 232, 1985.