

DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE CAFÉ CONILON (*Coffea canephora* PIERRE) PARA ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Maurício Reginaldo Alves dos Santos²; Maria das Graças Rodrigues Ferreira³; Vânia Sarubo⁴

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

² Pesquisador, D. Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, mauricio@cpafro.embrapa.br

³ Pesquisador, D. Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, mgraca@cpafro.embrapa.br

⁴ Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente – Universidade Federal de Rondônia, yannya26@yahoo.com

RESUMO: A cultura de *Coffea canephora* Pierre é extremamente relevante na agricultura de Rondônia, o segundo estado produtor e responsável por 15% da produção da variedade Conilon no país. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo eficiente de descontaminação de explantes foliares, visando à sua introdução em estudos de calogênese e embriogênese somática. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. As folhas foram lavadas em água bidestilada com auxílio de esponja e detergente. Em câmara de fluxo laminar, as mesmas foram imersas em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto e colocadas em soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,00, 1,25 e 1,50% (v/v), nos períodos de 10, 20 e 30 minutos, sendo, em seguida, segmentadas em pedaços de 1 cm² e inoculados em meio MS. Os cultivos foram mantidos em câmara tipo BOD, no escuro e com temperatura de 24±2°C. Cada unidade experimental foi constituída de 10 explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, agrupando-se as médias em classes distintas. Foi realizada uma avaliação dez dias após a inoculação. Os aspectos avaliados foram a porcentagem de contaminação e a porcentagem de explantes necrosados e oxidados. Os tratamentos mais eficazes para a desinfestação das folhas foram os que combinaram 30 minutos de imersão com as concentrações de 1,25 e 1,50% de hipoclorito de sódio, resultando em 15% de contaminação nos dois tratamentos. Porém, o tratamento que combinou 30 minutos com 1,50% de hipoclorito resultou em alto nível de oxidação (50%). O tratamento no qual se utilizou 1,00% de hipoclorito por 10 minutos foi o que resultou em maior nível de contaminação, chegando a 60% dos explantes inoculados, além de 10% de oxidação. Considerando-se as variáveis avaliadas, recomenda-se a utilização de 1,25% de hipoclorito, por um período de 30 minutos de imersão.

Palavras-chave: Estabelecimento *in vitro*, cultura de tecidos vegetais, cafeicultura, Rondônia.

DECONTAMINATION OF LEAF EXPLANTS FROM CONILON COFFEE (*Coffea canephora* PIERRE) FOR *IN VITRO* ESTABLISHMENT

ABSTRACT: The *Coffea canephora* Pierre culture is extremely important on Rondônia agriculture, the second state producer on the country, that contributes with 15% of the production of Conilon cultivar. The objective of this work was the establishment of an efficient protocol of decontamination of leaf explants of this cultivar to carry through studies of calogenesis and somatic embryogenesis. The experiments had been carried through in the Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais of Embrapa Rondônia. The leaves were washed in bidistilled water with detergent. In laminar flow chamber, they were immersed in 70% etanol (v/v) for 1 minute and sodium hypochlorite on the concentrations 1,00, 1,25 and 1,50% (v/v) for 10, 20 and 30 minutes. Leaves were cut in pieces of 1 cm² and inoculated in MS medium. Cultures were kept in BOD chamber at dark and 24±2°C. Experimental unit was constituted of 10 explants. An evaluation was carried through ten days after inoculation, considering the percentage of contamination, necrosis and oxidation. The treatments most efficient for decontamination were 30 minutes of immersion and sodium hypochlorite 1,25 and 1,50%, resulting in 15% of contamination in both treatments. However, 30 minutes of immersion in 1,50% sodium hypochlorite results in high level of oxidation (50%). 1,00% of hypochlorite for 10 minutes results in higher contamination reaching 60% and 10% of oxidation. For efficient decontamination it is recommendable the use of 1,25% sodium hypochlorite for 30 minutes of immersion.

Key words: *In vitro* establishment, plant tissue culture, culture of coffee, Rondônia.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura passou a se constituir em atividade econômica de grande importância para a Amazônia, especialmente para o estado de Rondônia, a partir da década de 1980. A área cultivada na Amazônia era pouco mais de 2.000 ha em 1975, ocorrendo aumento paulatino nos anos seguintes, atingindo em 1998, 137.261 ha e 151,76 mil hectares em 2008 (Anuário Estatístico do Café, 1995, 2001 e 2008).

Atualmente, o estado de Rondônia ocupa o sexto lugar na produção geral de café no país e tem no *C. canephora* sua maior expressão, posicionando-se em segundo lugar na produção desta espécie, destacando-se a cultivar Conilon entre as mais plantadas. O parque cafeeiro do Estado é da ordem de 288,5 milhões de covas, incluindo cafezais

em produção (151,90 mil hectares) e em formação (10,13 mil hectares), sendo responsável por 4,5% da produção geral de café e 15% do café Conilon produzido no país. (Conab, 2008; Anuário Brasileiro do Café, 2008).

Os aspectos relacionados às características de produção mostram que a prática da cafeicultura no estado é baseada na agricultura familiar, sendo que cerca de 90% das propriedades dos produtores possuem áreas de até 100 ha, com área média explorada com a cultura de 12,5 ha e produtividade média em 2005 foi de 16 sacas de café beneficiado por ha (ROSA NETO, 2005). A produtividade estimada para a próxima safra gira em torno de 12 sacas/ha (com aumento de 15% em relação à safra passada). Mesmo com aumento da produtividade, Rondônia está entre os estados produtores com as menores médias de produtividade, ficando somente na frente do Mato Grosso que na safra passada alcançou produtividade de 9,4 sacas/ha (Anuário Estatístico do Café, 2008).

Outro ponto a ser destacado é a importância da cultura na formação da renda da propriedade, significando, na média dos 122 produtores 58,43% de participação do total arrecadado em relação à atividade agropecuária como um todo, sendo que, para 67,2% o café responde com mais de 50% dessa renda. Tais dados mostram a importância da cafeicultura para a sustentabilidade da agricultura familiar no estado, o que reforça a necessidade de definição de políticas públicas para o setor, disponibilização de tecnologias apropriadas, assistência técnica, crédito rural e demanda por seus produtos, tanto em nível local como para exportação, no sentido de promover o desenvolvimento da região (Rosa Neto, 2005).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de selecionar e desenvolver genótipos resistentes a doenças, pois embora se encontre bastante adaptada, e ofereça maior facilidade de manejo, devido ao seu menor porte, a variedade Conilon apresenta suscetibilidade aos principais estresses bióticos da cultura na região, tais como ferrugem e nematóides (Souza et al., 2005).

Neste contexto, a biotecnologia se apresenta como alternativa viável e vantajosa de propagação dos materiais vegetais selecionados, pois permite a multiplicação uniforme e em larga escala, com alta qualidade fitossanitária, contribuindo dessa forma para o aumento da produtividade e qualidade do café produzido em Rondônia, influenciando positivamente os aspectos relacionados à qualidade de vida dos produtores rurais do estado.

O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento *in vitro* de material vegetal de *C. canephora* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, utilizando-se ensaios para descontaminação de folhas, visando à determinação de metodologia eficiente para a utilização posterior em estudos de calogênese e embriogênese somática.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. Foram utilizadas folhas provenientes de plantas do clone 194 de *C. canephora* Pierre pertencentes à variedade Conilon (clone 194, pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Rondônia), que foi desenvolvido, selecionado e disponibilizado pela Embrapa Rondônia e mantido em casa de vegetação.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 20,0 g.L⁻¹ de sacarose, extrato de malte 400 mg.L⁻¹, caseína hidrolisada 100 mg.L⁻¹ e solidificado com 0,8 % de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos.

Todas as manipulações foram efetuadas em capela de fluxo laminar. O material inoculado foi mantido em câmara tipo BOD, no escuro e com temperatura de 24±2°C. Cada unidade experimental foi constituída de 10 explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, agrupando-se as médias em classes distintas.

Foram coletadas folhas do segundo par dos ramos plagiotrópicos, as quais foram cuidadosamente lavadas com água bidestilada com auxílio de esponja e detergente. Em câmara de fluxo laminar, as mesmas foram imersas em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto e logo após foram colocadas em soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,00, 1,25 e 1,50% (v/v), nos períodos de 10, 20 e 30 minutos. Após este procedimento, foram segmentadas em pedaços de aproximadamente 1 cm² que foram inoculados com a face adaxial em contato com meio, em meio MS básico, sem a presença de reguladores. Foi realizada uma avaliação dez dias após a inoculação. Os aspectos avaliados foram a porcentagem de contaminação e a porcentagem de explantes necrosados e oxidados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a Tabela 1, aos 10 dias a partir da inoculação, os tratamentos mais eficientes para a desinfestação das folhas foram 8 e 9 (15% de contaminação em ambos), que combinaram o tempo de 30 minutos com as concentrações de hipoclorito de sódio de 1,25 e 1,50%. O tratamento 1 foi o que apresentou maior nível de contaminação chegando a 60% dos explantes inoculados. Teixeira et al. (2004) recomendaram álcool etílico comercial na concentração de 50 a 70%, por um período de 1 a 3 minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio a 0,5 a 2% (v/v) por 5 a 20 minutos, na desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais de *Coffea arabica* L. Devidos às condições amazônicas de alta umidade, não se conseguiu uma desinfestação eficiente com a utilização desse protocolo, sendo os resultados distintos dos alcançados por esses autores.

Tabela 1: Efeito dos tratamentos sobre a contaminação dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração de hipoclorito de sódio.

| Tratamentos | Tempo (minutos) | Concentração (%) | Contaminação (%) |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|
| 1 | 10 | 1,00 | 60 (a) |
| 2 | 10 | 1,25 | 50(ab) |
| 3 | 10 | 1,50 | 45(abc) |
| 4 | 20 | 1,00 | 35(bcd) |
| 5 | 20 | 1,25 | 30(cde) |
| 6 | 20 | 1,50 | 25(de) |
| 7 | 30 | 1,00 | 25(de) |
| 8 | 30 | 1,25 | 15(e) |
| 9 | 30 | 1,50 | 15(e) |

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Geralmente, no processo de desinfestação, é utilizado etanol a 70% durante alguns segundos, para eliminar bolhas de ar e parte dos lipídios, aumentando assim o contato do desinfestante com o material vegetal. Depois, o explante é mergulhado em hipoclorito de sódio em uma concentração que varia de 1 a 2% durante 10 a 30 minutos e em seguida são realizados enxágües em água estéril (Mateo-Sagasta, 1990).

Na Tabela 2 pode-se observar que, aos 10 dias a partir da inoculação, o tratamento no qual houve maior necrose das folhas foi o tratamento 9, que combinou o tempo de 30 minutos de imersão com a concentração de hipoclorito de sódio de 1,50%. O tratamento que apresentou menor número de explantes necrosados foi o tratamento 2, que combinou o tempo de 10 minutos de imersão com a concentração de hipoclorito de sódio de 1,25%.

Tabela 2: Efeito dos tratamentos sobre a necrose dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração de hipoclorito de sódio.

| Tratamentos | Tempo (minutos) | Concentração (%) | Necrose (%) |
|-------------|-----------------|------------------|-------------|
| 1 | 10 | 1,00 | 10(bc) |
| 2 | 10 | 1,25 | 5(c) |
| 3 | 10 | 1,50 | 10(bc) |
| 4 | 20 | 1,00 | 20(bc) |
| 5 | 20 | 1,25 | 25(bc) |
| 6 | 20 | 1,50 | 20(bc) |
| 7 | 30 | 1,00 | 25(bc) |
| 8 | 30 | 1,25 | 25(bc) |
| 9 | 30 | 1,50 | 50(a) |

Valores seguidos de letras distintas indicam diferença significativa, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Um processo de desinfestação eficaz é aquele que combina uma baixa taxa de contaminação e de necrose, com a menor exposição possível ao agente descontaminante (Torres et al., 1998). Deste modo, no presente estudo e utilizando explantes foliares de *C. canephora*, verificou-se que o tratamento que combinou um tempo de 30 minutos com a concentração de 1,25% de hipoclorito de sódio é o melhor tratamento para desinfestação, tendo em vista a relação entre o número de explantes contaminados (15%) e necrosados (25%).

CONCLUSÃO

Condições ideais de desinfestação dos explantes foliares *Coffea canephora* v. Conilon foram obtidas quando os mesmos foram tratados com álcool 70% por 1 minuto seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,25% (v/v) por 30 minutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DO CAFÉ 2008 Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2008. Disponível em: <http://www.anuarios.com.br/port/capitulo.php?idEdicao=45&intOrdem=1&idAnuario=#> Acesso em: 18 de Out 2008
 ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ 1995. Coffee Statistics Annuary 1995. Rio de Janeiro: Coffee Business, 1995. 57p.

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ 2000-2001.** Coffee Statistics Yearbook 2000-2001. 6.ed. Rio de Janeiro : Coffee Business, 2001. 161p.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ 2008.** Coffee Statistics Annuary 2008. Rio de Janeiro: Coffee Business, 2008. 68p.
- CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra Brasileira. Safra 2008 – 4ª estimativa.** Setembro 2008. Brasília: MAPA/SPC/DECAF/CONAB, 2008. 18p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/> Acesso em: 15/10/2008.
- MATEO-SAGASTA, L. A. **Cultivo in vitro de las plantas superiores.** Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 89-94, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- ROSA NETO, C. A agricultura de base familiar e sua importância para o processo de consolidação do agronegócio café em Rondônia: um estudo de caso. In: SIMPOSIO DE PESQUISAS DE CAFE DO BRASIL, 4, 2005. Londrina. **Anais...** Brasília, D.F. : Embrapa - Café, 5p. 2005.
- SOUZA, F. F.; SANTOS, M. M.; VENEZIANO, W.; NEVES, L. R. S. ; SOUZA, E. B. A.; SILVA, A. C. G. Obtenção de híbridos intra e intervarietais de café Robusta em Rondônia. In: SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFES DO BRASIL, 4, 2005. Londrina.. **Anais.** Brasília, D.F. : Embrapa - Café, 3p., 2005.
- TEIXEIRA, J.B., JUNQUEIRA, C.S., PEREIRA, A.J.P.C., MELLO, R.I.S., SILVA, A.P.D., MUNDIN, D.A.(2004). **Multiplicação clonal de café (Coffea arabica L.) via embriogênese somática.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Doc 40, 40 p., 2004.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq, 1999. 2v.298p.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. 1v.509p