

USO DO DELINEAMENTO DE PLACKETT-BURMAN PARA A SELEÇÃO RÁPIDA DE FATORES QUE INTERFEREM NO ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE *Coffea arabica* L

Tiago Teruel Rezende¹; Ricardo Nascimento Lutfala Paulino²; Samuel Pereira de Carvalho³; Julio Sílvio de Sousa Bueno Filho⁴; Leonardo Luiz Oliveira⁵; Janaina de Oliveira Menezes Fonseca⁶

¹Doutorando em Fitotecnia, bolsista CAPES, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, tiagoter@gmail.com

²Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, ricardonascimento@necafufla.com.br

³Professor DSc, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, samuelpc@dag.ufla.br

⁴Professor DSc, Departamento de Ciências Exatas, bolsista PPM, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, juliobuenof@gmail.com

⁵Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, agronleonardo@yahoo.com.br

⁶Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, jana_menezes_@hotmail.com

RESUMO: O aperfeiçoamento da metodologia para a produção de mudas de *Coffea arabica* L. via propagação vegetativa por estaquia, em escala comercial, torna-se importante para a sua disponibilização e adoção pelos produtores, pois possibilita a exploração comercial de híbridos que apresentem características superiores às das cultivares comerciais, o que pode representar um avanço nos programas de melhoramento genético da espécie *C. arabica*. Entretanto, há alguns entraves em produção de mudas através de seguimentos caulinares, como a diferença do período gasto na formação de raízes, no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. Portanto, o objetivo deste trabalho é otimizar o desenvolvimento de mudas formadas a partir de seguimentos caulinares, utilizando delineamento experimental apropriado que permitem o estudo simultâneo de vários fatores. O delineamento empregado na otimização dos processos possibilita o estudo simultâneo de um elevado número de fatores com um pequeno número de tratamentos, o que permite a triagem de fatores de maior efeito em estudo, e, em seguida, permite o estudo destes fatores para determinar os melhores níveis dos mesmos. O presente trabalho foi conduzido na área experimental da INOVACAFE localizada no departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG. Foi utilizado o delineamento de Plackett-Burman (1964) com 12 fatores e 16 ensaios e mais quatro repetições na condição de ponto central, totalizando 20 ensaios. Foram utilizados segmentos caulinares de ramos ortotrópicos de uma única progênie F₂. Após seis meses do início do experimento, foi avaliada a massa seca total das mudas formadas. Foi possível identificar fatores que têm efeito sobre o processo de enraizamento de segmentos caulinares de ramos ortotrópicos, de uma forma rápida e eficiente. Os fatores tiametoxam, AIB, tamanho da folha, sacarose e substratos serão utilizados na próxima etapa de otimização do processo de enraizamento de segmentos caulinares.

PALAVRAS-CHAVE: Otimização de processo, planejamento experimental, clonagem.

USE OF PLACKETT-BURMAN DESIGN FOR QUICK SELECTION OF FACTORS THAT INTERFERE WITH ROOTING OF CUTTINGS *Coffea arabica* L.

ABSTRACT: Perfecting *Coffea arabica* L. seedling production methodology via vegetative propagation through cutting technique, in commercial scale, is important in order to make the technique available to the producers, for it allows the commercial exploration of hybrids that present superior characteristics to the commercial cultivar. This may represent an advance in the genetic improvement programs for the *C. arabica* species. However, there are some obstacles in seedling production by means of stem segments, as the difference of the period required on root formation, growth and development of root and shoot. Therefore, the present study is aimed optimize the development of seedlings obtained by the rooting of stem segments, by using appropriate experimental designs that allow the simultaneous study of several factors. Experimental design used through process optimization enables the simultaneous study of a large number of factors with a small number of treatments that allows the screening of greater effect of factors under study, and then allows the study of these factors to determine the best levels of the same. This study was conducted in INOVACAFE the experimental field of the Department of Agriculture, the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras - MG. The experimental design consisted of Plackett-Burman (1964) with 12 factors and 16 trials and four replicates in the central point of condition, totaling 20 trials. Were used stem segments of orthotropic shoots, of a single progenies in the F₂ generation. Six months after the beginning of the experiment, we evaluated the total dry mass of seedlings formed. Was possible to identify factors that have an effect on the rooting process of stem segments of orthotropic shoots in a fast and efficiently. Factors thiamethoxam, AIB, sheet size, sucrose and substrates will be used in the next optimization step of rooting stem segments process.

KEYWORDS: Optimizing process, experimental design, cloning.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro, com isso, é de muito interesse o melhoramento genético, através da hibridação, do cafeeiro. Tendo então a introdução de meios biotecnológicos, como a clonagem por enraizamento de segmentos caulinares (estaquia), no qual o objetivo é obter plantas com todas as características da planta-mãe, e assim obter uma lavoura uniforme em relação ao porte, produtividade, maturação dos frutos e outras características de interesse. Este método foi inicialmente utilizado em *Coffea canephora*, por produtores do Espírito Santo e posteriormente analisado em *Coffea arabica* e observou-se que é viável, com a utilização de fitoreguladores e ambiente com umidade e temperaturas controladas. Como mencionado na literatura, a concentração do fitoregulador, o comprimento, o tipo de segmento caulinar e o ambiente de aclimação das mudas é de grande importância para se obter melhor eficiência do processo. Entretanto, há alguns entraves em produção de mudas através de seguimentos caulinares, como a diferença do período gasto na formação de raízes, no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. Portanto, o objetivo deste trabalho é otimizar o desenvolvimento de mudas formadas a partir de seguimentos caulinares, utilizando delineamentos experimentais apropriados que permitem o estudo simultâneo de vários fatores. Em experimentos com dois ou mais fatores quantitativos pode-se empregar o uso de arranjo fatorial completo. Nesse tipo de arranjo, o número de tratamentos é igual ao produto do número de níveis pelo número de fatores, sendo que todas as combinações são testadas e avaliadas. Montgomery (2009) enfatiza que dependendo da quantidade de fatores, a quantidade de tratamentos pode inviabilizar a utilização desse tipo de arranjo, pois à medida que o número de fatores cresce linearmente, a quantidade de tratamentos cresce geometricamente. O delineamento empregado na otimização dos processos possibilita o estudo simultâneo de um elevado número de fatores com um pequeno número de tratamentos, o que permite a triagem de fatores de maior efeito em estudo, e, em seguida, permite o estudo destes fatores para determinar os melhores níveis dos mesmos. A otimização de processos se divide em duas etapas, sendo a primeira uma seleção de fatores que tem influência sobre o processo, utilizando para isso delineamento de seleção, já a segunda etapa, ocorre um aprimoramento no qual possibilita o estudo dos níveis desses que melhor propicia o sucesso do processo em estudo, utilizando-se de delineamentos de aprimoramento. Com relação ao delineamento de seleção, Montgomery (2009) afirma que eles são geralmente realizados nos estágios iniciais da investigação, quando é provável que muitos fatores inicialmente considerados possuam pouco ou nenhum efeito sobre a variável de resposta. Nesta etapa pode-se utilizar o delineamento de Plackett-Burman e depois, no delineamento de aprimoramento, pode-se aplicar um arranjo fatorial completo ou um delineamento composto central com os fatores que têm efeitos significativos sobre o processo em estudo. Proposto por Plackett e Burman (1946), este delineamento consiste de planejamentos fatoriais de dois níveis para estudar até $K = N - 1$ variáveis em N ensaios, sendo N múltiplo de 4. Cada variável independente é representada em dois níveis, superior (+1) e inferior (-1), sendo que o número de vezes em que cada variável está presente nos níveis superior e inferior é o mesmo. O nível intermediário é codificado como (0). Apesar de em vários estudos o delineamento de Plackett-Burman ter sido utilizado em sua forma clássica saturada, $K = N - 1$ variáveis em N ensaios (Kammoun et al., 2008), recomenda-se que o número de ensaios exceda em pelo menos quatro o número de variáveis independentes estudadas para a estimativa do erro experimental. Objetivo do trabalho foi selecionar os principais fatores que influenciam o processo de enraizamento por meio do delineamento de Plackett-Burman.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido na área experimental da INOVACAFE localizada no departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG. Foi utilizado o delineamento de Plackett-Burman (1964) com 12 fatores e 16 ensaios e mais quatro repetições na condição de ponto central, totalizando 20 ensaios. Cada ensaio foi composto por três segmentos caulinares de 5 cm de comprimento, totalizando 60 segmentos caulinares utilizados nesta etapa. Os fatores como os respectivos níveis superior (+1), inferior (-1) e central (0) são apresentados na Tabela 1.

Foram utilizados segmentos caulinares de ramos ortotrópicos de uma única progênie F_2 . Os segmentos caulinares foram cortados e preparados para terem apenas um par de gemas vegetativas. Em seguida, os fatores V1, V2, V5, V8, V9 e V10 foram aplicados no momento da instalação do experimento, enquanto que o fator V7 e V12 foram aplicados três vezes, sendo a primeira no momento da implantação, a segunda aplicação será aos 15 após a instalação e a terceira aos 30 dias.

A matriz do delineamento de Plackett-Burman (matriz de Hadamard) foi obtida por meio da função `hadamard()` da biblioteca `survey` (Lumley, 2004) do software R (R Development Core Team, 2013) e está representada na Tabela 2.

Tabela 1. Identificação dos fatores a serem utilizados na etapa de seleção e respectivos níveis.

Fatores	Codificação	Unidade	Níveis		
			-1	0	+1
<u>Osmocote</u>	V1	<u>g/tubete</u>	0	3	6
Sulfato de Zinco	V2	10 ml da solução/ <u>tubete</u>	0	1,5	3
Substrato	V3	120 ml/ <u>tubete</u>	Areia	<u>Vermiculita + Areia</u>	<u>Vermiculita</u>
Tipo de Estaca	V4	-	Terra	Mediana	Lenhosa
<u>Tiametoxam</u>	V5	<u>ml/tubete</u>	0	0,5	1
Tipo Corte Base Estaca	V6	-	Reto	"V"	<u>Bisel</u>
Sacarose	V7	Solução 10 %	Substrato	-	Folhas
Antioxidante	V8	<u>ml/L</u>	0	15	30
Ácido Bórico	V9	10 ml da solução/ <u>tubete</u>	0	1,5	3
Ácido <u>Indol Butírico</u>	V10	<u>mg/L</u>	0	3000	6000
Tamanho das Folhas	V11	Área foliar remanescente (%)	33	50	100
Aplicação de sacarose	V12	-	Raiz	-	Foliar

Tabela 2. Matriz do delineamento de Plackett-Burman para os doze fatores e vinte ensaios.

Ensaio	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1
3	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	-1
4	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
7	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
8	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
9	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
10	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1
12	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1
13	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1
14	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
15	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1
16	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
17	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Após seis meses após a instalação do experimento, foi avaliada a massa seca total das mudas formadas. Para a análise estatística foi utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{11} \beta_i \chi_i$$

onde,

Y : variável resposta observada;

β_0 : é o intercepto do modelo;

β_i : é o coeficiente linear associado ao fator i ;

χ_i : é o nível do fator i . ($i = 1, 2, \dots, 12$)

Este modelo assume que não há interação entre os fatores e, portanto, será utilizado apenas para selecionar os fatores que têm efeito significativo sobre o processo de enraizamento dos segmentos caulinares. Todas as análises estatísticas do trabalho serão feitas por meio do software R (R Development Core Team, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 3 as estimativas dos efeitos e sua influência (ao nível de significância de 10%) no processo de obtenção de mudas clonais por meio do enraizamento de segmentos caulinares de uma progênie F_2 de *Coffea arabica*. Nesta etapa de seleção de fatores é plausível o uso de um nível de significância de até 10% visto que se trata de uma etapa de triagem, seleção de fatores que influenciam o processo em estudo. Nota-se que o fator antioxidante, tiametoxam, AIB, tamanho da folha, boro, sacarose e substrato tiveram efeito sobre o processo de enraizamento de segmentos caulinares de ramos ortotrópicos. Destes, apenas o tiametoxam, o AIB, o tamanho da folha e a sacarose apresentaram efeito positivo no processo, enquanto o antioxidante e substrato tiveram efeito negativo, considerando apenas os resultados para massa seca total da muda formada.

O fato do antioxidante ter efeito negativo indica uma tendência de redução da massa seca total conforme a dose é aumentada, e tendo em vista que o intervalo de dose utilizada para este fator foi de 0 a 30 ml/L este fator pode ser excluído da próxima etapa. Já para o fator substrato, os níveis utilizados neste estudo foram areia (-1), areia+vermiculita

(0) e vermiculita (+1), como o efeito foi negativo, indica que o substrato composto por areia seja o mais indicado para o processo de enraizamento, ou então um substrato mais poro que permita uma boa drenagem da água, tendo portanto bastante espaços vazios entre as partículas do substrato. Portanto, para a próxima etapa do processo de otimização, pode-se testar substratos contendo diferentes proporções de areia e vermiculita, ou mesmo outros compostos que deem estas características de alta porosidade, baixa retenção de água.

Tabela 3. Estimativas dos efeitos dos fatores no processo de obtenção de mudas clonais por meio do enraizamento de segmentos caulinares de uma progênie F₂ de *Coffea arabica* L.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	t	p-valor
(Intercepto)	0,5627	0,0728	7,7280	0,0000
Aplicação de Sacarose	-0,0750	0,0814	-0,9210	0,3616
Zinco	-0,1250	0,0814	-1,5360	0,1313
Antioxidante	-0,3808	0,0814	-4,6780	0,0000
Tipo de estaca	0,0267	0,0814	0,3280	0,7447
Corte da estaca	0,0500	0,0814	0,6140	0,5420
<u>Tiametoxam</u>	0,1725	0,0814	2,1190	0,0394
AIB	0,2467	0,0814	3,0300	0,0040
Tamanho da folha	0,4058	0,0814	4,9860	0,0000
<u>Osmocote</u>	-0,1000	0,0814	-1,2280	0,2254
Boro	-0,4825	0,0814	-5,9270	0,0000
Sacarose	0,1500	0,0814	1,8430	0,0717
Substrato	-0,17333	0,0814	-2,129	0,03849

Com relação aos fatores que tiveram efeito positivo, para a próxima etapa do processo de otimização é necessário utilizar níveis que entre o maior nível testado nesta etapa para que se consiga determinar um ponto que otimize a processo. Neste caso é recomendado a utilização de delineamento do tipo composto central, o qual permite ajustar superfícies de respostas nas quais podem ser determinados os pontos de otimização.

CONCLUSÕES

Foi possível identificar fatores que têm efeito sobre o processo de enraizamento de segmentos caulinares de ramos ortotrópicos, de uma forma rápida e eficiente. Os fatores tiametoxam, AIB, tamanho da folha, sacarose e substratos serão utilizados na próxima etapa de otimização do processo de enraizamento de segmentos caulinares.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa Pesquisador Mineiro (PPM).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KAMMOUN, R., NAILI, B., Bejar, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture médium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*, v.99, n.13, p.5602-5609, 2008.
- PLACKETT, R.L., BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, v 33,p. 305-325, 1946.
- LUMLEY ,T. Analysis of complex survey samples. *Journal of Statistical Software*, v.9, n.1, p.1-19, 2004
- MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. Ed 7. John Wiley & Sons, Inc, 2009. 656 p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 12 mar. 2013.