

# O USO DE SUPORTES DE BAIXO CUSTO EM PROCESSOS DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL DE CAFÉ NAS FASES DE ENRAIZAMENTO E DE ACLIMATIZAÇÃO

Radjiskumar MOHAN; Camila B. SUAREZ; Luiz A. BIASI<sup>2</sup>; Carlos R. SOCCOL<sup>1</sup> E-mail: soccol@ufpr.br

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Unidade de Biotecnologia Industrial, Depto. De tecnologia Química. Curitiba, PR -Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Depto. de Agronomia. Curitiba, PR - Brasil

## Resumo:

Para a obtenção de mudas (material vegetal) sadias de espécies de café em maior quantidade e em tempo reduzido, utiliza-se a técnica de micropropagação vegetal. Essa técnica é realizada em diferentes etapas, desde o isolamento até o transporte para *extra vitro*. Cada etapa demanda tempo e gera custos onerosos, sendo ainda necessário otimizar o rendimento. Para melhorar o processo total é essencial que cada etapa colabore com o máximo de rendimento, no menor tempo e com o menor custo possível. Este trabalho teve como focos as etapas de enraizamento e de aclimatização com as seguintes mudanças previstas: o enraizamento destes micro-tecidos propagados em meio de cultura modificado (substituição do meio semi-sólido por bagaço de mandioca e/ou bagaço de cana-de-açúcar) e a sua fácil aclimatização (permanência de curto tempo nas condições de aclimatização e a rápida formação de sulcos para facilitar a transferência das mudas). Comparando os resultados obtidos utilizando-se meio alternativo em relação ao meio comercial (contendo Gelrite), observou-se que, no meio contendo mistura de bagaço de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar (20:80), o tamanho das raízes foi em média 20,4% superior, o tamanho da planta foi 10,9% superior, o número de folhas foi 26% superior e o número de raízes formadas foi 8% superior. Em relação à porcentagem de enraizamento, o meio com substrato alternativo apresentou 80% e o meio comercial apresentou 66,67% de êxito. Nos testes de aclimatização foi obtida uma sobrevivência de 100% para os dois tipos de meio, entretanto houve uma pequena diferença em relação aos números de folhas geradas.

Palavras-chave: Micropropagação, enraizamento de café, suporte alternativo, bagaço de cana-de-açúcar, aclimatização.

## USE OF LOWCOST SUPPORTS IN PLANT MICROPROPAGATION PROCESSES OF COFFEE ON THE STEPS OF ROOTING AND ACCLIMATIZATION

### Abstract:

To obtain healthy plant materials of coffee species in big quantities and in reduced time the technique of plant micropropagation is generally used, carried through different stages, since isolation till *extra vitro* acclimatization. Each stages demand time and generates high costs, having still to consider the gain factor. For the improvement of the total process, it is essential that each stage collaborate with a maximum gain, in a short time and a low cost. This work was focuses to the rooting and acclimatization stages with the following possible changes: rooting of micro propagated explants in modified culture medium (substitution of the semisolid medium with cassava and/or sugarcane bagasse) and its fast acclimatization (permanence of short time in the acclimatization conditions and the fast formation of root ridges to facilitate the transference of the plants). Comparing the results from the alternative medium related to the commercial medium (containing Gelrite), it was observed that the medium containing the bagasse mixture (cassava and of sugarcane bagasse, 20:80), the root size was in average 20.4% superior; the size of the explants was 10.9% superior; the number of leaf's was 26.0% superior and the number of formed roots was 8% superior. For rooting percentage, the medium with alternative substrate presented 80.00% and the commercial medium 66. 67%. Acclimatization tests showed a small difference related to the new generated leaf numbers and the survival range was of 100% in both media.

*Key words:* Micropropagation, coffee rooting, alternative supports, sugarcane bagasse, and acclimatization.

## Introdução

Nos processos de produção de álcool, açúcar e outros derivados da cana-de-açúcar, bem como na indústria da fécula, são geradas grandes quantidades de resíduos e subprodutos. No caso específico dos bagaços de cana-de-açúcar e de mandioca, em vez de os mesmos serem utilizados apenas como combustíveis na geração de energia, buscaram-se alternativas para sua utilização como substratos ou suportes em diferentes processos biotecnológicos. Uma dessas alternativas seria sua utilização como suporte em processos para micropropagação e enraizamento de tecidos vegetais de plantas.

Tais técnicas foram usadas com sucesso no enraizamento de espécies de macieira e de morango e na micropropagação do morango (OKAMOTO, 2001; MOHAN, 2001; 2002; 2004; LUSA, 2002).

A micropropagação de plantas se refere a técnicas de clonagem realizadas *in vitro*. A maioria dos protocolos comerciais de micropropagação utiliza meristemas apicais e/ou axilares da planta-mãe, os quais são induzidos a se multiplicarem através da adição de citocininas nos meios de cultura. Em seguida, os brotos obtidos são enraizados, mediante o uso de auxinas, e transferidos à casa de vegetação.

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental e os Estados Unidos. Os laboratórios comerciais surgiram, na sua grande maioria, agregados aos viveiros a partir da iniciativa das próprias companhias produtoras de mudas. Estes laboratórios trabalham com o objetivo de satisfazer às necessidades internas de material de propagação livre de doenças ou de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa.

A aplicação de métodos de micropropagação apresenta grandes vantagens sobre os métodos tradicionais de propagação vegetativa, particularmente para espécies tropicais que produzem níveis elevados de fenóis e taninos, os quais podem inibir o enraizamento e a enxertia. Esses métodos encurtam o tempo requerido para o melhoramento, uma vez que permitem clonar alguns indivíduos selecionados em grande quantidade. Além disso, a heterozigose das populações clonadas é conservada durante a micropropagação. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de enraizamento e de aclimatização de explantes de café micropropagados em meios de suportes alternativos à base de resíduos agro-industriais em substituição ao ágar.

## Material e Métodos

O material vegetal (*Coffea arabica* var. *Catuai vermelho*) usado nos experimentos veio previamente tratado em forma de embriões somáticos oriundo de IAPAR, Londrina-PR. A partir disso foram preparados os explantes *in vitro*. Foi desenvolvida uma técnica própria de micropropagação, descrita na tabela 01 em anexo. Foi então multiplicada uma grande quantidade de material vegetal *in vitro* para serem utilizados nos experimentos de enraizamento e de aclimatização. Os meios de cultivo foram baseados no protocolo de MURISHAGE e SKOOG (1962), com modificações parciais.

O preparo do suporte, com bagaço de cana-de-açúcar procedeu-se nas seguintes etapas: seleção da parte interna (miolo) do bagaço sem partes danificadas; lavagem do bagaço em água corrente quente (2 vezes) para remoção de açúcares; lavagem em água destilada para remoção de sais; secagem em estufa a 90°C por 24h; fracionamento do bagaço em moinho de faca/martelo em frações menores; moagem em um moinho rotativo com uma peneira específica desenvolvida (dados não serão discutidos nesta parte ainda); classificação das partículas por um conjunto de peneiras (0,84 mm, 0,84 a 0,18 mm e < 0,18 mm); extração dos compostos fenólicos com solvente em coluna (3 cm de diâmetro e altura de 35 cm), preenchida com 10 g de bagaço (granulometria < 0,18 mm). A composição do solvente, bem como as condições de extração, não podem ser divulgadas, uma vez que o processo está em vias de ser patenteado. A figura 01 mostra a transformação do bagaço de cana-de-açúcar até a sua forma em pó tratado.

Já o bagaço de mandioca não recebeu qualquer tratamento prévio. Foi apenas moído, classificado e seco a 90°C por 2 h. A granulometria utilizada foi < 0,18 mm. Foi preferido trabalhar com frações de < 0,18 mm dos substratos, aproveitando os resultados apresentados pelos autores MOHAN *et al.*, 2004, em experimentos quase iguais realizados com espécies vegetais de macieira e processo patenteado conforme protocolo 931/2001.

Foram realizadas várias testes de enraizamento com combinações variadas de substratos (%) como pré-análise e foram analisados 5 explantes por combinação. A partir do melhor resultado da combinação mandioca/cana-de-açúcar foram estudados os efeitos específicos, como número de folhas, número de raízes, altura dos explantes, porcentagem de enraizamento e os efeitos de aclimatização em relação às provas (experimentos paralelamente conduzidos em meio de cultivo convencional, por exemplo, uso de suporte à base de ágar). O meio de enraizamento foi igual ao meio de micropropagação, diferindo apenas pela substituição de BA (Benzyladenine purine) por ácido indolbutírico (IBA) 0,5mg/L e o ágar pela mistura de dois bagaços moídos e tratados (mandioca e cana-de-açúcar) em várias porcentagens (proporções mandioca/cana-de-açúcar: 20/80, 30/70, 40/60, 50/50). Esta mesma técnica foi aplicada com sucesso em espécies vegetais de morango cv. *Dover* e *Camarosa*. As condições de cultura em estufa foram padronizadas (24 ± 2°C, fotoperíodo de dezesseis horas).

Todos os meios tiveram o pH ajustado em 5,6 antes da adição de ágar e foram esterilizados em uma autoclave (a uma pressão de 1,05kgf/cm<sup>2</sup> e temperatura de 121°C) durante vinte minutos.

## Resultados e Discussão

Os pré-experimentos do enraizamento em meio alternativo foram realizados durante 45 dias, utilizando explantes de *Coffea arabica* var. *Catuai vermelho*. Os resultados foram comparados aos frascos controle com ágar. Os resultados obtidos para as diferentes combinações dos suportes alternativos (bagaço de mandioca / bagaço de cana de açúcar tratado) foram:

20/80: apresentou uma ótima adaptação;	30/70: apresentou adaptação satisfatória;
40/60: apresentou crescimento insuficiente;	50/50: apresentou crescimento insuficiente.

A adição de bagaço de mandioca foi feita para conferir uma melhor consistência ao suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar, além de servir como uma fonte alternativa de carbono. A consistência desejada é obtida devido à presença de amido residual no bagaço de mandioca que, uma vez umidificado (com o meio de cultivo), torna-se mais espesso. Pode-se observar que uma alta porcentagem de amido não tem efeito positivo na qualidade do suporte. A alta concentração de amido deve endurecer muito o suporte, formando um semi-sólido mais rígido e impedindo assim a transferência e a absorção dos nutrientes pelo explante. Também deve estar diminuindo muito a umidade do meio. A mistura que continha menor quantidade de amido (20/80%) apresentou melhor crescimento e adaptação. Esta combinação foi escolhida para realizar os testes específicos e comparativos.

A partir dos resultados apresentados na tabela 01 em anexo, pôde-se observar que o suporte alternativo à base de bagaço misto teve um melhor desempenho em todos os aspectos. A diferença no número de raízes (8%) apresentou um valor abaixo do desejável. Isso é normal em espécies vegetais de café. Essas espécies, na fase de enraizamento, têm a tendência de gerar uma única raiz. Raramente esses números são duplicados ou triplicados. Durante os experimentos, foram obtidos alguns explantes com duas ou três raízes induzidas. Durante essa etapa, a influência da auxina utilizada (IBA) não mostrou efeito significativo na indução das raízes.

Pode-se observar que a diferença no comprimento das raízes foi significativamente alta (20,40 %). Isso significa que o efeito do substrato alternativo na fase de alongamento foi positivo, devido provavelmente à boa oxigenação promovida por um suporte com aspecto poroso. A presença de oxigênio dissolvido do meio é um fator limitante tanto na indução como no alongamento da raiz. No meio à base de gel, a quantidade de oxigênio dissolvido deve ser menor em comparação com o meio alternativo.

Uma vez promovido o bom desenvolvimento das raízes - tanto em qualidade quanto em quantidade - segue-se uma boa absorção e transferência dos nutrientes presentes no meio, que por ser poroso facilita a difusão desses nutrientes. Isso justifica as diferenças obtidas no número de folhas geradas (26,00%) e na altura dos explantes (10,90%).

A porcentagem de enraizamento também foi maior no meio alternativo, indicando que esse suporte fornece condições favoráveis à indução de raízes. Vale lembrar que explantes de café (espécies lenhosas) são normalmente difíceis de serem enraizados. A porcentagem de enraizamento é um dos fatores limitantes na determinação do rendimento e do custo em processos de clonagem e de micropropagação de mudas.

Na etapa de aclimatização, os explantes enraizados foram transplantados para cubetes (20x20) contendo como substrato produto comercial Plantmax/Vasomax (3/1), em estufa aclimatizada. Após 12 dias de irrigação intermitente, os cubetes foram transferidos para outra parte da casa de vegetação, onde receberam irrigação manual. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de folhas, porcentagem de sobrevivência e de desenvolvimento radicial (formação de sulcos com o substrato em relação ao tempo). Foram utilizados explantes enraizados no substrato alternativo e no meio comercial, contendo Gelrite, para servir como prova para os outros experimentos. Os resultados são fornecidos em anexo na tabela 2. As figuras 2 e 3 mostram as evoluções das mudas na fase de enraizamento e a formação do sulco, respectivamente. Houve um pequeno aumento no número de folhas nos explantes enraizados em meio alternativo quando comparados com a prova. Foi obtido 100% de aclimatização nos dois meios, mas a grande diferença foi registrada na formação do sulco, que apresentou maior quantidade de raízes em menor tempo de permanência na casa de vegetação no explante que foi enraizado no meio alternativo (a figura 3 em anexo mostra bem as diferenças entre os dois).

Além da vantagem citada acima, outro benefício foi gerado em decorrência da pequena mudança na técnica de aclimatização, a redução parcial dos custos ligados ao processo total.

## Conclusões

Quanto ao processo de enraizamento em substratos alternativos (bagaço de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar), o qual foi o objetivo principal do projeto, bons resultados foram obtidos nas duas etapas. Isso demonstra que o suporte alternativo, desde que receba tratamento prévio adequado, é uma alternativa econômica e eficiente em relação ao meio comercial tradicionalmente empregado.

## Anexos



Fig. 1- Substrato natural bagaço de cana-de-açúcar - A, miolos selecionados, lavados e secos; B, fragmentação em partes menores; C, parte contendo ligninas e fibras duras separadas; D, substratos (celulose e hemicelulose) selecionados, após tratamento físico-químico, prontos para serem adicionados como meio de cultura alternativo.



Fig. 2 - Aparência das mudas em aclimatização depois de 30 dias, A - Meio comercial (gelrite); B - Meio alternativo (substrato).



Fig.3 -Visualização dos sulcos formados (raízes e terra) depois de 30 dias de permanência na casa de vegetação, A - Meio comercial (gelrite); B - Meio alternativo.

Tabela 1 – Resultados finais comparativos entre os dois diferentes suportes, à base de Gelrite e à base de mistura de bagaço de mandioca e cana-de-açúcar, 20/80 % (meio alternativo), depois de 60 dias de cultivo.

Tempo – 60 dias	Suporte à base de gel	Suporte à base de mistura alternativa	Dif. %
Nº médio de raízes*	1,42± 0,18	1,53± 0,08	8,00
Tamanho médio das raízes*	2,79± 0,12 (cm)	3,36± 0,22 (cm)	20,40
Nº médio de folhas*	7,31± 1,21	8,34 ± 0,32	26,00
Altura média dos explantes*	3,83 ± 0,11 (cm)	4,24± 0,02 (cm)	10,90
% de enraizamento*	66,67	80,00	19,99

\*média de 8 explantes ± desvio padrão.

Tabela 2 - Resultados parciais comparativos entre os dois diferentes suportes, à base de Gelrite e à base de mistura de bagaço de mandioca e cana-de-açúcar, 20/80 % (meio alternativo) apresentados durante a etapa de aclimatização com respeito ao número de folhas e à porcentagem de enraizamento dos explantes.

Tempo (dias)	No. de folhas (média*)		% sobrevivência*	
	Comercial	Sup. alternativo	Comercial	Sup. Alternativo
Início	4,0	4,0	100	100
15	6,0	6,2	100	100
30	9,2	10,0	100	100

\*média de 8 explantes.

## Referências Bibliográficas

LUSA, C.L.; MOHAN, R.; OKAMOTO, G.T.; SOCCOL, C.R.; DOMIT, R. (2002). Desenvolvimento de bioprocessos para micropropagação e enraizamento de tecidos vegetais de morango cv *Dover* em meio sólido a base de bagaço de cana-de-açúcar. 10º EVINCI, Universidade Federal do Paraná – Centro Politécnico: 29-31 de Outubro.

MOHAN, R.; OKAMOTO, G.T.; QUOIRIN, M.G.; SOCCOL, C.R. (2001). Estudo de um novo suporte para enraizamento de micro-estacas *in vitro*. VII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTO, Universidade Federal do Paraná - Centro Politécnico: 3-5 de Outubro.

MOHAN, R.; LUSA, C.L.; OKAMOTO, G.T.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G. (2002). Use of sugarcane bagasse as a low cost support material for *in vitro* micropropagation. VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas – Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual do Paraná: 2-6 de Dezembro.

MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G.; PANDEY, A. (2004). Use of sugarcane bagasse as an alternative low cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In vitro: Plant and Tissue Culture*, vol. 40, Issue 4 (July-August).

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

OKAMOTO, G.T.; MOHAN, R.; QUOIRIN, M.G.; SOCCOL, C.R.; JORGE, R.M.M. (2001). Estudo de um novo suporte para enraizamento de micro-estacas *in vitro*. 4º CONGRESSO BRASILEIRO DE - ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA – COBEQ - IC, Universidade Estadual de Maringá – Centro de Tecnologia: 14-16 de Novembro.