

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Occidental



ISSN 1517-3135

Dezembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 100

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Ronaldo Ribeiro Morais
Cheila de Lima Boijink
Kátia Emidio da Silva
Regina Caetano Quisen*

Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Edsandra Campos Chagas, Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo, Jony Koji Dairiki, José Clério Rezende Pereira, Kátia Emídio da Silva, Lucinda Carneiro Garcia, Maria Augusta Abtibol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Rogério Perin, Ronaldo Ribeiro de Moraes e Sara de Almeida Rios.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Lúcio Rogerio Bastos Cavalcanti*

1ª edição

1ª impressão (2012): 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Amazônia Ocidental.

Morais, Ronaldo Ribeiro et al.

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Regina Caetano Quisen et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012.

320 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 100).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

Estabelecimento In Vitro de Explantes de Cultivares de Seringueira

Vanessa dos Santos Queiroz

Regina Caetano Quisen

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de agentes desinfestantes no estabelecimento in vitro de explantes de seringueira, sendo realizados ensaios com explantes foliares e segmentos de integumento interno de sementes imaturas de diferentes cultivares. O tratamento de assepsia com integumento resultou no controle total da contaminação com imersão dos explantes em álcool e hipoclorito de sódio. Os ensaios com pré-tratamento de explantes foliares em soluções de Cercobin®, Agrimicina® e PPM® por 12 horas, seguidos de álcool, hipoclorito de sódio comercial e HgCl₂, não foram eficientes, resultando em 100% de contaminação. Também resultou em perda total dos explantes inoculados em meio suplementados com Dithane®, Vitavax® e Viper®, assim como no ensaio com óleos essenciais de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) adicionados ao meio a 0,3 µl mL⁻¹. Quando essa concentração foi aumentada para 0,6 µl mL⁻¹; 0,9 µl mL⁻¹ ou 1,2 µl mL⁻¹ de mesmos óleos, obteve-se maior eficiência no controle da contaminação, associada ou não ao antibiótico estreptomicina. Ao final da fase de estabelecimento, observou-se alteração da coloração inicial dos explantes, com

possibilidade de comprometimento da capacidade morfogênica desses tecidos devido à fitotoxicidade do meio, sugerindo-se a suplementação com agentes antioxidantes em ensaios posteriores.

Palavras-chave: cultura de tecidos de plantas, *Hevea* spp., assepsia, fungicidas, óleos essenciais.

Introdução

A contaminação na cultura de tecidos de plantas é considerada um dos grandes entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies tropicais, pois além de causar grandes prejuízos no processo de micropropagação, ao deixar o explante inapto para o subcultivo e levando-o à morte, pode constituir-se na maior barreira para a definição de tecnologias de propagação em escala de produção, assim como na aplicação de técnicas de melhoramento genético *in vitro* de espécies florestais. Dantas et al. (2002) reforçam a ideia de que medidas de controle e prevenção da contaminação microbiana adotadas devem proporcionar um ambiente desfavorável para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sem, no entanto, causar prejuízos ao desenvolvimento do explante.

Assim como para muitas espécies tropicais de interesse comercial, poucos são os relatos sobre o desenvolvimento de protocolos de desinfestação para o estabelecimento de explantes de seringueira (*Hevea* spp.), aspecto este que se caracteriza como entrave na adoção de técnicas de propagação de plantas *in vitro* no programa de melhoramento genético dessa cultura.

Considerando a importância da cultura de tecidos como ferramenta de grande valor frente aos gargalos tecnológicos enfrentados pela heveicultura e visando contribuir com subsídios para o desenvolvimento de técnicas *in vitro* para *Hevea* spp., este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes métodos de assepsia em explantes de clones produtivos de seringueira.

Material e Métodos

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental, no Município de Manaus, Estado do Amazonas. Foram utilizados como explantes segmentos de folhas e do integumento interno de sementes imaturas de clones de seringueira, os quais foram submetidos a diferentes agentes desinfestantes visando ao controle da contaminação dessas culturas após estabelecimento *in vitro*. Em todos os ensaios utilizou-se como meio de cultura a formulação básica de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração original de sais, suplementado com sacarose (3%) e geleificado com ágar (0,6%), sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121 °C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão.

Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz a 26 ± 2 °C, onde permaneceram por 15-20 dias, sendo ao final de cada período realizadas avaliações que consistiram no registro da ocorrência de contaminantes, sobrevivência e oxidação de explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância para a comparação de médias dos tratamentos.

Ensaio I – Integumento interno de sementes imaturas de clones de seringueira

Em ambiente asséptico de fluxo laminar, frutos imaturos de dois clones de seringueira (CPAA C01 e CPAA C06) foram imersos em álcool 70% por 30 segundos, depois 10 ou 30 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v), e enxaguados abundantemente em água estéril. Com auxílio de pinça e bisturi, os frutos foram abertos e cuidadosamente isolados os segmentos do integumento interno com dimensões aproximadas de 1 cm², os quais foram lavados em hipoclorito de sódio comercial a 0,5% (v/v), enxaguados em água estéril e inoculados em meio básico MS/2.

Os tratamentos foram testados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri com seis explantes.

Ensaio II – Segmentos de folhas de clones de seringueira: imersão em PPM® e fungicidas

Folhas de dois clones de seringueira (C13 e C60) foram lavadas com água e sabão e cortadas em tiras com 1 cm de largura (região da nervura central) e imersas em soluções de Cercobin® e Agrimicina®, ambos a 0,2% (p/v), consistindo o tratamento 1, e em PPM® a 3% (v/v), tratamento 2. Após 12 horas, os explantes foram levados para ambiente asséptico de fluxo laminar e imersos em álcool 70% por 60 segundos, seguidos 20 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v), e em bicloreto de mercúrio (HgCl₂) a 0,25% (p/v) por 30 segundos, sendo, ao final, enxaguados abundantemente em água estéril. Antes da inoculação em meio básico MS/2, os explantes foram reduzidos a dimensões menores (segmentos de 1 cm²).

Os tratamentos foram testados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri com seis explantes.

Ensaio III – Segmentos de folhas de clones de seringueira: inclusão de fungicidas no meio de cultura

Folhas do clone de seringueira CNS AM 7905 foram lavadas com água e sabão e cortadas tiras com 1 cm de largura (região da nervura central), e em ambiente asséptico de fluxo laminar imersos em álcool 70% por 60 segundos, seguidos 30 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v), sendo ao final enxaguados abundantemente em água estéril. Os explantes foram reduzidos a segmentos de 1 cm², sendo inoculados em meio básico MS/2, suplementados com os fungicidas Dithane® (tratamento 1), Vitavax® (tratamento 2) e Viper® (tratamento 3), todos a 0,2%.

Os tratamentos foram testados em delineamento inteiramente casualizado com 11 repetições, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri com sete explantes.

Ensaio IV – Segmentos de folhas de clones de seringueira: óleos essenciais – clone CSN AM 7905

Folhas do clone de seringueira CNS AM 7905 foram lavadas com água e sabão e cortadas tiras com 1 cm de largura (região da nervura central), e em ambiente asséptico de fluxo laminar imersos em álcool 70% por 60 segundos, seguidos 30 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v), sendo ao final enxaguados abundantemente em água estéril. Os explantes foram reduzidos a segmentos de 1 cm², sendo inoculados em meio básico MS/2, suplementados com 0,3 µl mL⁻¹ dos óleos essenciais de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) – óleo 1, e *Lippia sidoides* – óleo 2, na presença ou ausência de uma gota do mesmo óleo sobre o explante, além dos tratamentos controle (1) – meio sem óleo e (2) – meio sem óleo e com emulsificador Tween 80®.

Os tratamentos foram testados em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri com quatro explantes.

Ensaio V – Segmentos de folhas de clones de seringueira: óleos essenciais – clone C06

Folhas do clone de seringueira C06 foram lavadas com água e sabão e cortadas tiras com 1 cm de largura (região da nervura central), e em ambiente asséptico de fluxo laminar imersos em álcool 70% por 60 segundos, seguidos 30 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v), sendo ao final enxaguados abundantemente em água estéril. Os explantes foram reduzidos a segmentos de 1 cm², sendo inoculados em meio básico MS/2 e suplementados com 0,3 µl mL⁻¹ e 0,6 µl mL⁻¹ dos óleos essenciais de pimenta-de-macaco (*P. aduncum*) – óleo 1, e *L.*

sidoides – óleo 2, na presença ou ausência do antibiótico estreptomicina a 150 mg L^{-1} , além dos tratamentos controle (1) meio sem óleo e (2) meio sem óleo e com emulsificador Tween 80®.

Os tratamentos foram testados em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri com dois explantes.

Ensaio VI – Segmentos de folhas de clones de seringueira: óleos essenciais – clone CPAA C01

Folhas do clone de seringueira CPAA C01 foram lavadas com água e sabão e cortadas tiras com 1 cm de largura (região da nervura central), e em ambiente asséptico de fluxo laminar imersas em álcool 70% por 60 segundos, depois 30 minutos em hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v), sendo ao final enxaguados abundantemente em água estéril. Os explantes foram reduzidos a segmentos de $1,0 \text{ cm}^2$, sendo inoculados em meio básico MS/2, suplementados com $0,3 \mu\text{l mL}^{-1}$, $0,6 \mu\text{l mL}^{-1}$ e $1,2 \mu\text{l mL}^{-1}$ dos óleos essenciais de pimenta-de-macaco (*P. aduncum*) – óleo 1, e *L. sidoides* – óleo 2, na presença ou ausência do antibiótico estreptomicina a 150 mg L^{-1} .

Os tratamentos foram testados em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri com quatro explantes.

Resultados e Discussão

No ensaio de assepsia com integumento interno de sementes imaturas dos clones CPAA C01 e CPAA C06 não houve a infestação por microrganismos nas culturas estabelecidas, haja vista a eficácia da metodologia e agentes desinfestantes utilizados para esse tipo de explante. A utilização de tecido interno e protegido pelo fruto como fonte de explante influenciou em grande parte o sucesso do controle da

contaminação, entretanto os tratamentos prévios à inoculação (lavagem, álcool e hipoclorito de sódio) foram igualmente importantes para a eliminação dos microrganismos exógenos.

Contrário ao sucesso obtido nesse primeiro experimento, nos ensaios II e III, nos quais foram utilizados o PPM® e os fungicidas Cercobin® e Agrimicina® nos banhos dos explantes e como suplementação ao meio de cultura (Dithane®, Vitavax® e Viper®), os resultados obtidos demonstraram baixa eficiência da desinfestação, resultando em 100% de contaminação dos tecidos em ambos os tratamentos do ensaio II e, no ensaio III, de 100%, 93,5% e 96% para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Nesses casos, deve-se considerar que a dosagem utilizada e a falta da especificidade dos fungicidas podem ter influenciado os resultados. O PPM® (Ensaio 2), biocida de amplo espectro, e de acordo com Barrueto Cid e Jordan (2006), apresenta alto poder biocida, também não foi capaz de controlar a contaminação, mesmo associado ao cloreto de mercúrio.

No Ensaio IV, apesar de menos agressiva, a contaminação ocorreu em 100% dos explantes em todos os tratamentos.

Os tratamentos aplicados no Ensaio V (Tabela 1) diferiram estatisticamente entre si, onde a pimenta-de-macaco apresentou elevadas taxas de contaminação por fungos, e o óleo de alecrim-pimenta controlou o aparecimento de microrganismos na desinfestação de explantes foliares de seringueira. Oliveira et al. (2008) igualmente comprovaram que o óleo de *L. sidooides* reduziu significativamente e de maneira progressiva o desenvolvimento de fungos como controle alternativo de contaminantes encontrados em laboratório de cultura de tecido de plantas.

Apesar da eficiência da ação do óleo na assepsia, observou-se que 100% dos segmentos foliares apresentaram alteração na coloração dos explantes, com comprometimento da capacidade morfogênica desses tecidos devido à fitotoxicidade do meio, sugerindo-se a suplementação com agentes antioxidantes em ensaios posteriores.

Tabela 1. Estabelecimento in vitro de segmentos foliares de *Hevea* spp. em meio MS/2, suplementados com óleo essencial de pimenta-de-macaco (*P. aduncum*) e alecrim-pimenta (*L. sidoides*).

Espécie	Óleo ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Estreptomicina (mg L^{-1})	Perda em %	
			Bactéria	Fungo ^{ns}
Pimenta-de-macaco	0,6	0	100,0 a	4,2
	0,9	0	83,3 ab	0,0
	1,2	0	83,3 ab	0,0
Alecrim-pimenta	0,6	150	0,0 c	0,0
	0,9	150	0,0 c	0,0
	1,2	150	0,0 c	0,0
Pimenta-de-macaco	0,6	0	50,0 abc	0,0
	0,9	0	4,2 c	0,0
	1,2	0	33,3 bc	0,0
Alecrim-pimenta	0,6	150	0,0 c	0,0
	0,9	150	0,0 c	0,0
	1,2	150	0,0 c	0,0

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conclusões

Nas condições testadas no presente trabalho, pode-se concluir que:

- A sequência de desinfestação para o estabelecimento de integumento interno de frutos imaturos de *Hevea* spp. foi 100% eficiente.
- A utilização do biocida PPM[®] e dos fungicidas Cercobin[®], Agrimicina[®], Dithane[®], Vitavax[®] e Viper[®] não controlaram o crescimento de microrganismos em explantes foliares de *Hevea* spp., seja na forma de banhos dos explantes, seja como suplemento ao meio de cultura.

- Concentrações de óleo de alecrim-pimenta superiores a $0,6 \mu\text{l mL}^{-1}$ controlaram a contaminação de explantes foliares de *Hevea* spp. associados ou não ao antibiótico estreptomicina.
- A capacidade morfogênica dos tecidos foliares foi comprometida devido à fitotoxicidade do meio como consequência da elevada concentração dos óleos essenciais, sugerindo-se a suplementação com agentes antioxidantes em ensaios posteriores.

Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Ocidental, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, e ao CNPq, pela concessão da bolsa de Iniciação de Científica.

Referências

BARRUETO CID, L. P.; JORDAN, M. Z. **A contaminação in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 122). 20 p.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo in vitro de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 10, p. 391-407, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-4997, 1962.

OLIVEIRA, O. de R. de; TERAQ, D.; PORTUGAL, A. C. P. de; INNECO, R.; ALBUQUERQUE, C. C. de. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, p. 94-100, 2008.