

Desinfestação de Explantes Caulinares de Bacurizeiro por Hipoclorito de Sódio e Biclreto de Mercúrio^[1]

Fabício Napoleão Andrade^[2], Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza^[3], Kaesel Jackson Damasceno e Silva^[4] e Eduardo Magno Pereira da Silva²

Introdução

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), planta pertencente à família Clusiaceae, apresenta uma particularidade em sua propagação, onde ocorre a emergência da radícula entre 15 e 30 dias e da parte aérea a partir de 180 dias após a sementeira, podendo prolongar-se por período superior a 700 dias (Rodrigues, 2000).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998). Muitas espécies tropicais, como fruteiras e essências florestais, que possuem sementes recalcitrantes têm se mostrado de difícil propagação e conservação pelos métodos tradicionais (Mendes & Goes, 1996). Essas dificuldades de propagação pelos métodos tradicionais têm levado a pesquisa a buscar novas alternativas tecnológicas, como as técnicas de micropropagação. No bacurizeiro, espécie típica de sementes recalcitrantes, ainda se conhece muito pouco sobre a sua susceptibilidade à micropropagação (Souza et al. 2000).

A técnica de micropropagação tem como princípio básico a totipotência que, na definição de Steward (1963), é a capacidade da célula vegetal gerar uma nova planta normal quando lhe são propiciadas as condições adequadas de nutrição e ambiente.

A contaminação dos explantes é um dos principais problemas do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (Pierik, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microorganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (Medeiros, 1999).

Grattapaglia & Machado (1998) mencionam que uma das principais dificuldades na micropropagação de espécies lenhosas, como o bacurizeiro, é a obtenção de tecidos não contaminados e sugerem o uso do etanol, do hipoclorito de sódio e do hipoclorito de cálcio como substâncias desinfestantes.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio e de bicloreto de mercúrio na desinfestação de explantes caulinares de bacurizeiro.

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no período de outubro a dezembro de 2000, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI.

Utilizou-se como fonte de explantes ápices caulinares, provenientes de plantas de bacurizeiro de aproximadamente dois anos de idade, mantidas em condições de viveiro protegido. Após coletados, os segmentos de ramos contendo os ápices caulinares permaneceram 30 minutos em recipiente com água corrente. Posteriormente, foram imersos em álcool etílico 70% por 30 segundos e, em seguida, aplicados os tratamentos, que consistiram em cinco tempos de imersão (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) dos explantes em

dois desinfestantes (hipoclorito de sódio a 1% e bicloreto de mercúrio a 0,02%). Todo o procedimento de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Realizada a assepsia, segmentos de ramos foram lavados três vezes consecutivas em água destilada estéril e, em seguida, os explantes foram excisados e transferidos para tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ de ágar, 0,1 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIB. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem em vapor úmido por 15 minutos, com temperatura de 121°C e 1 atm de pressão. Durante o período de incubação, os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob condições controladas, com 16 horas de fotoperíodo em luz branca fria de 1000 lux de intensidade luminosa e temperatura de 26°C ± 1°C.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 5 x 2, com seis repetições e unidade experimental constituída de quatro tubos com um explante por tubo.

As avaliações foram realizadas semanalmente até aos 30 dias do início da incubação dos explantes. Os níveis de contaminação foram avaliados por meio de uma escala de notas variando de 0 a 10, onde 0 = 0% de contaminação e 10 = 91-100% de contaminação, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

Resultados e Discussão

A análise de variância indicou efeito ($P < 0,05$) de tratamento com desinfestantes em todas as avaliações realizadas. O uso do bicloreto de mercúrio resultou em menores índices de contaminação quando comparado ao tratamento controle e ao hipoclorito de sódio, porém, sem diferir significativamente deste último (Tabela 1). Em seu estudo, Rodrigues (2000) observou que o tratamento com termoterapia a 40°C por 10 minutos seguido da assepsia com hipoclorito de sódio a 2% resultou em maior eficiência no controle de contaminantes.

Tabela. 1. Níveis de contaminação de explantes caulinares de bacurizeiro com hipoclorito de sódio e do bicloreto de mercúrio. Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, 2001.

Desinfestantes	Período de avaliação em semanas ¹			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
	----- Médias de contaminação ----- (%)			
Hipoclorito de sódio (1%)	29,56 ab	38,95 ab	46,90 ab	54,40 b
Bicloreto de mercúrio (0,02%)	19,61 b	29,73 b	38,32 b	45,44 b
Controle	41,35 a	56,28 a	62,50 a	74,26 a
C.V. (%)	27,66	31,87	25,97	28,65

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($P > 0,05$).

Houve efeito ($P < 0,05$) de tempo de imersão e da interação desinfestante x tempo de imersão e, por isso, a análise foi decomposta por desinfestante, cujos resultados são

apresentados na Tabela 2. Para o hipoclorito de sódio, a maior eficiência (45,21% de contaminação ao final da quarta semana de incubação) ocorreu quando o tempo de imersão foi de 15 minutos. A menor eficiência ocorreu para o tempo de imersão de 5 minutos (66,8%), não diferindo do tratamento controle. Em relação ao bicloreto de mercúrio, a maior eficiência (35,10% de contaminação após 30 dias de incubação) ocorreu para o tempo de imersão de 10 minutos, o qual não diferiu do tempo de 15 minutos. O tempo de imersão por 5 minutos foi o menos eficiente, resultando numa taxa de contaminação de 59,06% aos 30 dias de incubação e não diferindo do tratamento controle. Em estudos semelhantes com cajazeira (Souza et al. 2000) e com umbu-cajazeira (Silva et al. 2002) obtiveram as melhores respostas foram obtidas com tempo de imersão por 5 minutos em hipoclorito de sódio (1%) e por 10 minutos em bicloreto de mercúrio (0,02%).

Tabela 2. Níveis de contaminação de explantes caulinares de bacurizeiro submetidos a diferentes tempos de imersão (T.I.) em hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio. Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, 2001.

Desinfestantes	T.I. (min.)	Período de avaliação em semanas ¹			
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
	0	----- Médias de contaminação -----			
	0	(%)			
Hipoclorito de sódio (1%)	0	41,35 a	56,28 a	62,50 a	74,26 a
	5	38,25 a	48,25 ab	57,16 a	66,80 ab
	10	28,15 bc	37,81 c	45,51 b	50,45 bc
	15	22,52 c	31,55 c	40,39 b	45,21 c
	20	29,30 abc	38,20 bc	44,52 b	55,15 bc
C.V. (%)		21,76	16,11	18,21	14,05
Bicloreto de mercúrio (0,02%)	0	41,35 a	56,28 a	62,50 a	74,26 a
	5	28,25 b	39,64 b	50,20 a	59,06 ab
	10	10,24 c	23,10 c	29,40 c	35,10 c
	15	13,25 c	23,45 c	33,29 bc	38,48 bc
	20	26,71 b	32,73 b	40,41 b	49,10 b
C.V. (%)		23,29	11,05	10,34	9,93

¹ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P > 0,05).

Conclusões

1. Tanto o bicloreto de mercúrio quanto o hipoclorito de sódio tiveram nível de controle aceitável na desinfestação de explantes caulinares de bacurizeiro, sendo, porém, o bicloreto de mercúrio mais eficiente.
2. A imersão em solução de bicloreto de mercúrio a 0,02% por 10 minutos foi o tratamento mais eficiente em promover a desinfestação em explantes caulinares de bacurizeiro.

Referências Bibliográficas

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:

EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.183-260.

MEDEIROS, C.P.C. de. **Indução in vitro de respostas morfogenéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MENDES, R.A.; GOES, M. de. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. da (Ed.). **Conservación de germoplasma vegetal**. Montivideo: IICA - PROCISUR, 1996. p.129-138. (PROCISUR. Dialogo, 45).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

PIERIK, R.L.M. Vegetative propagation. In: PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. [S.I.]: Intenational Association for Plant Tissue Culture, 1990. p.183-230.

RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento do eixo embrionário in vitro e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Wildenow & Sprengel) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Mart.)**. 2000. 60f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, E.M.P. de; SOUZA, V.A.B. de; SILVA, K.J.D. e; ANDRADE, F.N. Efeito de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio na desinfestação de explantes caulinares de umbu-cajazeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Anais ...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. CD-ROM.

SOUZA, V.A.B. de; SOUZA, C.L.C. de; OLIVEIRA, D.B. de. Efeito de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio na desinfestação de explantes de cajazeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza, CE. **Anais ...** Foraleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. CD-ROM.

STEWART, F.C. The control of growth in plant cells. **Scientific America**, v.10, p.1-11, 1963.

[1] Pesquisa desenvolvida com apoio financeiro do Banco do Nordeste.

[2] Aluno de Engenharia Agrônômica da UFPI, Bolsista do CNPq-FAPEPI/Embrapa Meio-Norte. Cx. Postal 1, 64006-220, Teresina, PI.

[3] Eng. Agr., Ph.D., Pesquisador da Embrapa Meio-Norte. Cx. Postal 1, 64006-220, Teresina, PI. E-mail: valdo@cpamn.embrapa.br

[4] Aluno de Engenharia Agrônômica da UFPI, Bolsista PIBIC/CNPq. E-mail: kdamasceno@yahoo.com.br.