

DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES FLORAIS DE CUPUAÇUZEIRO

Maria das Graças Rodrigues Ferreira¹; Maurício Reginaldo Alves dos Santos² e Ana Cleide Ribeiro Bragado³

Resumo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para a desinfestação de explantes florais de cupuaçuzeiro, visando ao seu estabelecimento *in vitro*. Botões florais fechados, oriundos de cupuaçuzeiros sem sementes, foram lavados com água destilada e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em câmara de fluxo, os botões foram imersos em hipoclorito de sódio a 0,25 e 0,50%, durante 20 e 30 minutos, e lavados 3 vezes com água estéril. Os botões foram segmentados em pétala, estaminóide, lígula e ovário, os quais foram inoculados em meio MS, com e sem cefotaxima (100 mg.L⁻¹) e gelificado com 0,8% de ágar. Avaliou-se a contaminação dos explantes nos 20 dias subsequentes. Na ausência de antibiótico, independente da concentração de hipoclorito e tempo de imersão, a contaminação variou de 20 a 73%. Com a utilização de antibiótico, a contaminação variou de 6 a 20%, sendo que os melhores resultados ocorreram com as imersões por 30 minutos em hipoclorito a 0,25% e por 20 minutos em hipoclorito a 0,50%.

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) destaca-se entre as fruteiras amazônicas como uma das mais atrativas da região, pelas características de sabor e aroma de seus frutos, cuja polpa é empregada no preparo de sucos, sorvetes, licores, compotas, geléias, cremes, etc. Instituições de pesquisas na região Norte têm implementado programas de melhoramento com ênfase à seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer), principal enfermidade da cultura. Neste contexto, objetiva-se com a propagação *in vitro*, a minimização destes problemas pela aquisição de material propagativo vegetal livre de fitopatógenos. Outra vantagem da micropropagação é permitir a obtenção de maior quantidade de mudas em um curto período de tempo, quando comparado com a propagação vegetativa tradicional.

A primeira etapa da micropropagação é o estabelecimento *in vitro* do material a ser multiplicado e, para tanto, deve-se determinar a melhor metodologia para desinfestação dos explantes a serem inoculados. Em espécies lenhosas, a contaminação dos explantes é um dos principais problemas do cultivo *in vitro* (PIERIK, 1990) e depende também da procedência do material vegetal utilizado, que pode ser de casa de vegetação ou do campo. Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. Contudo, mesmo as plantas submetidas ao 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). Na maioria dos casos, a presença de fungos e bactérias ocorre poucos dias após a inoculação. Em alguns casos, a presença de bactérias e fungos nas plantas é detectada após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está em produção. Além disso, por serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação dos explantes para a inoculação *in vitro*. Quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH) tornam-se favoráveis ao seu desenvolvimento, os fitopatógenos passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes, podendo levá-los rapidamente à

¹ Maria das Graças Rodrigues Ferreira é Pesquisadora da Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, PortoVelho, RO, CEP 76815-800. E-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br

² Maurício Reginaldo Alves dos Santos é Pesquisador da Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, PortoVelho, RO, CEP 76815-800. E-mail: mauricio@cpafro.embrapa.br

³ Ana Cleide Ribeiro Bragado é Bolsista de Iniciação Científica do PNP&D/Café na Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, PortoVelho, RO, CEP 76815-800. E-mail: anaefo@hotmail.com

morte. Esta deterioração dos explantes está relacionada com a produção de metabólitos fitotóxicos pelos fitopatógenos, tais como os ácidos láctico e acético e cianeto (PEREIRA *et al.*, 2003). Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para a desinfestação de explantes florais de cupuaçuzeiro, visando ao seu estabelecimento *in vitro*.

Material e Métodos

Foram coletados botões florais em estágio anterior à antese, oriundos de plantas de cupuaçu sem sementes, coletados no campo experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, RO. Os materiais foram conduzidos ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde passaram por uma pré-limpeza, empregando-se uma esponja umedecida com água destilada e algumas gotas de detergente comercial. Após esse procedimento, os botões foram lavados com água destilada e, em seguida, colocados em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram retirados do álcool e esterilizados com concentrações de 0,25 e 0,50% de hipoclorito de sódio, durante 20 e 30 minutos, sendo, em seguida, lavados 3 vezes com água bidestilada estéril e os explantes dispostos em placa de Petri contendo papel de filtro estéril. Empregando-se outra placa de Petri estéril, os botões foram segmentados, com a ajuda de bisturi, em pétala, estaminóide, lígula e ovário. Esses explantes ficaram imersos em solução anti-oxidante, constituída por uma mistura de 100 mg de ácido ascórbico e 150 mg de ácido cítrico, dissolvida em 1 litro de água, sendo sua esterilização feita em filtro bacteriológico de 0,22 ou 0,45 micras, por dez minutos. Em seguida, os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem reguladores de crescimento, acrescido de 3,0% de sacarose, com e sem cefotaxima (100 mg.L⁻¹) e gelificado com 0,8% de ágar. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 8 horas a 28° C, durante 20 dias, sendo avaliado o número de explantes contaminados ao final desse período.

Resultados e Discussão

Verificamos que, na ausência de antibiótico, independente da concentração de hipoclorito e tempo de imersão, os explantes apresentaram diferentes níveis de contaminação, variando de 20 a 73% (Tab.1). Com a utilização de antibiótico, a contaminação variou de 6 a 20%, sendo que os melhores resultados ocorreram com as imersões dos explantes por 30 minutos em hipoclorito a 0,25% e por 20 minutos em hipoclorito a 0,50%.

Conclusões

Recomendamos a desinfestação de botões florais de cupuaçu nas concentrações de 0,50% de hipoclorito de sódio durante 20 minutos, e 0,25% durante 30 minutos, bem como a adição de 100 mg.L⁻¹ de cefotaxima ao meio de cultivo.

Referências

- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PEREIRA, J. E.S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003.

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

Tabela 1. Porcentagens de contaminação de explantes florais de cupuaçu em meio com e sem utilização de antibiótico no meio, imersos em hipoclorito de sódio a diferentes concentrações e períodos de imersão.

Meio com antibiótico				
Explante	Concentração	Tempo	Necrose	(%)Explantes contaminados
Ovário	0,25	20'	-	6,66
Lígula			-	20,00
Estaminódio			-	20,00
Pétala			-	13,33
Ovário	0,25	30'	-	-
Lígula			-	-
Estaminódio			-	-
Pétala			-	-
Ovário	0,50	20'	-	-
Lígula			-	-
Estaminódio			-	-
Pétala			-	-
Ovário	0,50	30'	6,66	-
Lígula			13,33	-
Estaminódio			6,66	-
Pétala			-	-
Meio sem antibiótico				
Ovário	0,25	20'	-	73,33
Lígula			-	66,66
Estaminódio			-	20,00
Pétala			-	46,66
Ovário	0,25	30'	-	20,00
Lígula			-	40,00
Estaminódio			-	-
Pétala			-	40,00
Ovário	0,50	20'	-	26,66
Lígula			-	60,00
Estaminódio			-	40,00
Pétala			-	73,33
Ovário	0,50	30'	-	20,00
Lígula			-	46,66
Estaminódio			-	26,66
Pétala			-	66,66