SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

PROPAGAÇÃO IN VITRO DE CUPUAÇUZEIRO: desinfestação de explantes florais

IN VITRO PROPAGATION OF *Theobroma grandiflorum(cupuaçu tree)*: surface sterilization of floral explants

Maria das Graças Rodrigues Ferreira[1]
Maurício Reginaldo Alves dos Santos[2]
Ana Cleide Ribeiro Bragado[3]

RESUMO: O 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 um 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 três vezes com água estéril. Os botões foram segmentados em pétala, estaminóide, lígula e ovário, os quais foram inoculados em meio MS contendo ágar (8 $g.L^{-1}$), com e sem cefotaxima (100 $mg.L^{-1}$). Avaliou-se a contaminação dos explantes nos 20 dias subseqüentes e constatou-se que a utilização de antibiótico no meio de cultura foi essencial para o controle da contaminação. A fim de reduzir a oxidação dos tecidos, devido ao maior tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, recomenda-se a concentração de 0,25% e 20 minutos de imersão dos explantes.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo *in vitro*. Hipoclorito de sódio. Cefotaxima

ABSTRACT: The study aimed to develop a protocol for the surface sterilization of cupuaçu tree floral explants and its establishment *in vitro*. Closed flower buds from cupuaçu seedlees were washed with distilled water and immersed in 70% alcohol (v / v) for one minute. In flow chamber, the buds were immersed in sodium hypochlorite at 0.25 and 0.50% during 20 and 30 minutes and washed three times with sterile water. The buds were segmenteds in petal, staminode, ligule and ovary, which were inoculated on MS medium with agar (8 $g.L^{-1}$) in the presence and absence of cefotaxime (100 $mg.L^{-1}$). It was evaluated the contamination of explants after 20 days and observed that the use of antibiotic in culture medium was essencial to control the contamination. In order to reduce oxidation of the tissues due to the longer time of exposure to sodium hypochlorite it is recommended concentration of 0.25% and 20 minutes of immersion of explants.

KEYWORDS: In vitro culture. Sodium hypochlorite. Cefotaxime

1. 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

[1] Agrônoma, Drª, Pesquisadora Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, Porto Velho, RO. CEP - 76815-800. E-mail: mgraca@cpafro.embrapa.br.
[2] Biólogo, Drº, Pesquisador Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, Porto Velho, RO. CEP - 76815-800. E-mail: mauricio@cpafro.embrapa.br.
[3] Acadêmica do curso de Engenharia Florestal, Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e Letras de Rondônia, Br 364, Km 6,5, sn - Campus FARO. Porto Velho, RO. CEP - 78914-751. E-mail: anaefo@hotmail.com.

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

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 perniciosa* (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. Após a escolha do tecido que será empregado como explante, procede-se o tratamento de desinfestação do mesmo, a fim de eliminar microorganismos exógenos, para a obtenção de um bom resultado no final do processo de estabelecimento *in vitro* (GAMBORG & PHILLIPS, 1995; ROCHA; 1999; SOUZA et al., 2003; SILVA et al., 2003).

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 (Smith, 2000), comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes (Montarroyos, 2000), podendo levá-los rapidamente à morte. Esta deterioração dos

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

explantes está relacionada com a produção de metabólitos fitotóxicos pelos fitopatógenos, tais como os ácidos láctico e acético e cianeto (PEREIRA et al., 2003).

Um problema freqüente durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos, que são liberados pelas células, relatam GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998). Segundo Teixeira (2006), a oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas, que se pode ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula.

Para minimizar a contaminação microbiana, inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores. Estes relatam o uso de substâncias como hipoclorito de sódio e etanol 70% e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (GARCIA & RAFAEL, 1990; LEIFERT et al., 1991;BUCKLEY et al., 1995; TANPRESERT & REED, 1998; REED et al., 1998). A utilização de antibióticos para o controle e erradicação de microrganismos contaminantes é frequente, podendo os mesmos serem adicionados ao meio de cultura ou imersão dos em banhos sob agitação, durante alguns dias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A concentração da solução desinfestante e o tempo de exposição podem variar muito os índices de descontaminação, no que se faz necessário à adequação do protocolo de desinfestação. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para a desinfestação de explantes florais de cupuaçuzeiro, visando ao seu estabelecimento *in vitro*.

2. 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 um minuto. Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram retirados do álcool e esterilizados com

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

concentrações de 0,25 e 0,50% de hipoclorito de sódio, durante 20 e 30 minutos, sendo, em seguida, lavados três 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 antioxidante, constituída por uma mistura de 100 mg de ácido ascórbico e 150 mg de ácido cítrico, dissolvida em um 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 solidificado com ágar (0,8%). Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2, combinando duas concentrações de hipoclorito de sódio (0,25% e 0,50%), dois tempos de imersão (20 e 30 minutos), na presença e ausência de antibiótico, consistindo de oito tratamentos. Foram empregadas três placas de Petri com meio contendo cinco explantes cada uma, totalizando 15 repetições. Os dados foram analisados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificamos que na ausência de antibiótico, empregando-se 0,25% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão (T1), todos os explantes empregados apresentaram as maiores porcentagens de contaminação (Figura 1). No tratamento 2 (0,25% de hipoclorito de sódio e 30 minutos de imersão), as contaminações foram menores apenas com o emprego de ovário e estaminódio, não diferindo estatisticamente para lígula e pétala, com relação ao T1. No tratamento 3 (0,50% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão), não houve diferença significativa apenas com o emprego de estaminódio, sendo que os demais explantes apresentaram menores porcentagens de contaminação, em relação ao tratamento 2. O tratamento 4 (0,50% de hipoclorito de sódio e 30 minutos de imersão) apresentou

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

diferença significativa apenas para estaminódio, sendo que os demais explantes empregados não diferiram estatisticamente do tratamento 3.

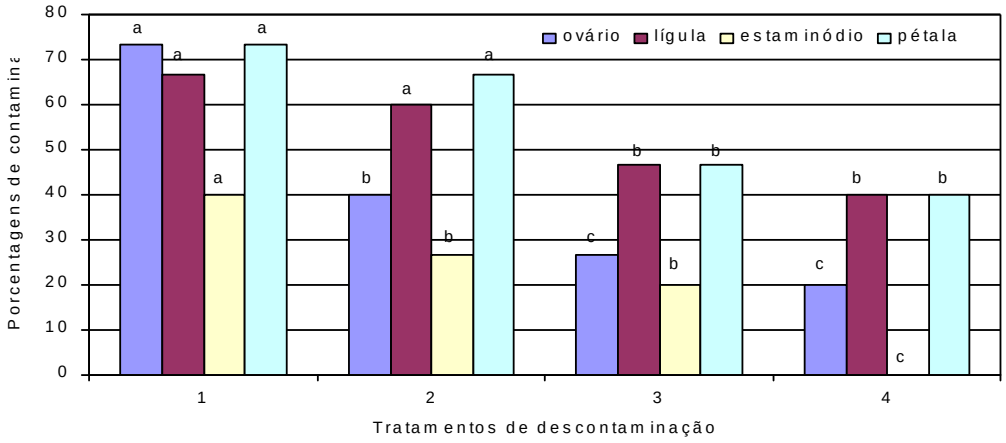

Figura 1. Porcentagens de contaminação de explantes florais de cupuaçu em meio **sem utilização de antibiótico**, imersos em hipoclorito de sódio a diferentes concentrações e períodos de imersão. Tratamento 1 – 0,25% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão; Tratamento 2 - 0,25% de hipoclorito de sódio e 30 minutos de imersão; Tratamento 3 – 0,50% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão; Tratamento 4 – 0,50% de hipoclorito de sódio e 30 minutos de imersão. Letras diferentes indicam significância a 5%, pelo teste de Tukey. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

Na Figura 2 observamos os resultados da descontaminação dos explantes na presença de antibiótico. Com exceção do Tratamento 5 (0,25% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão), os explantes não apresentaram contaminação nos demais tratamentos testados. Contudo, a utilização de concentrações maiores de hipoclorito de sódio (0,50%) e maior tempo de imersão dos explantes (30 minutos) proporcionou as menores taxas de contaminação, porém danificaram os tecidos, provocando escurecimento e necrose, resultando na inibição do desenvolvimento e morte dos explantes. Resultados semelhantes foram observados por Moraes et al. (2007) estudando a desinfestação de gemas axilares de abacaxi submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão. Em protocolo de micropropagação de *Ananas comosus*, Teixeira et al. (2001) recomendam 0,5 a 1,0% de hipoclorito de sódio durante 10 a 20 minutos na obtenção de mudas.

Constatou-se no presente estudo que a utilização de antibiótico no meio de cultura foi essencial para o controle da contaminação em explantes florais de cupuaçu, permitindo o seu estabelecimento *in vitro*. Duhem et al. (1988), em estudos com café e cacau, observaram que a presença da cefatoxima sódica no meio de cultivo, promovia o controle da contaminação, além de não causar efeito tóxico às plantas. Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues (2005), que

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

testou cefotaxima e cloranfenicol, isolados e em combinação, para o controle de microrganismos endofíticos no estabelecimento *in vitro* de *Heliconia rauliniana*, observando que a cefotaxima aplicada isoladamente, na concentração de 500 $mg.L^{-1}$ foi a forma mais eficiente de controle dos microrganismos. Costa et al. (2007) verificaram que a utilização do antibiótico cefotaxima proporcionou um efeito positivo no controle do crescimento bacteriano e sobrevivência de explantes de alecrim-pimenta.

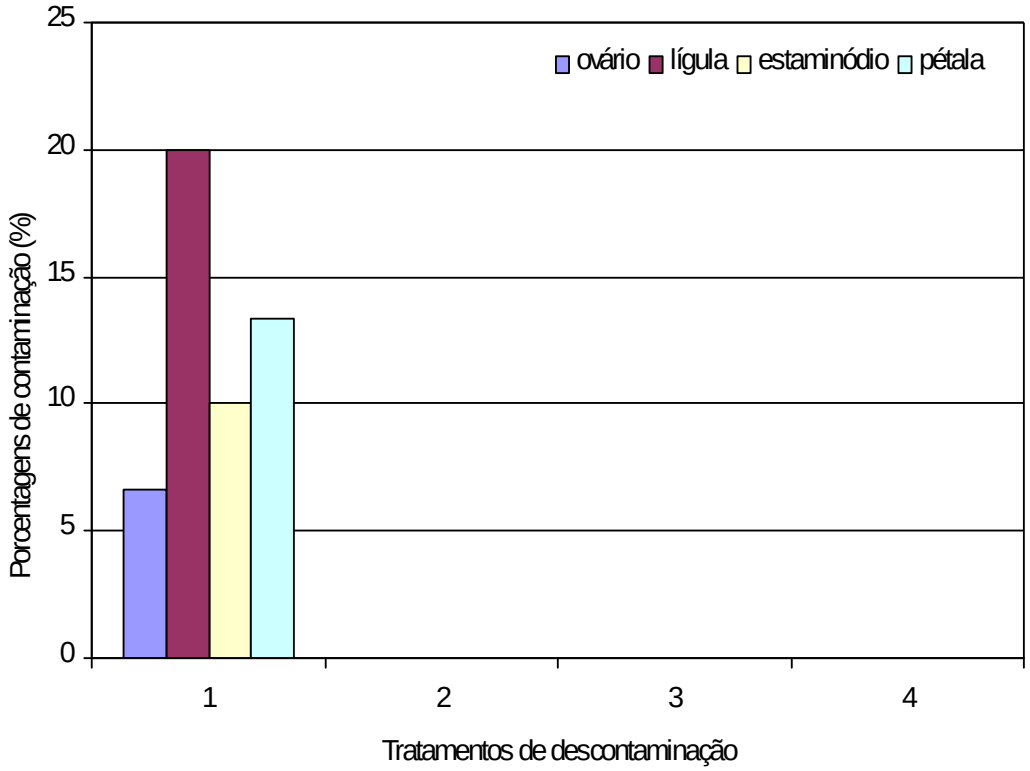

Figura 2. Porcentagens de contaminação de explantes florais de cupuaçu em meio **com utilização de antibiótico**, imersos em hipoclorito de sódio a diferentes concentrações e períodos de imersão. Tratamento 5 – 0,25% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão; Tratamento 6 - 0,25% de hipoclorito de sódio e 30 minutos de imersão; Tratamento 7 – 0,50% de hipoclorito de sódio e 20 minutos de imersão; Tratamento 8 – 0,50% de hipoclorito de sódio e 30 minutos de imersão. Letras diferentes indicam significância a 5%, pelo teste de Tukey. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2009.

4. CONCLUSÕES

- Recomenda-se a utilização da menor concentração de hipoclorito de sódio (0,25%) com 20 minutos de imersão dos explantes, o que auxilia na redução da oxidação dos tecidos, para descontaminação de explantes florais de cupuaçu.
- A adição de antibiótico ao meio de cultura torna-se necessária para controlar a contaminação em explantes florais de cupuaçu.

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro concedido a este trabalho através do projeto "**Desenvolvimento de biotecnologias para o programa de Melhoramento do Cupuaçuazeiro**".

6. REFERÊNCIAS

BUCKLEY, P.; De WILDE, T.; REED, B. ***Caracterization and identification of bacteria isolated from micro propagated mint plants****. In Vitro Cellular* **& Developmental** *Biology,* v.31, p. 58-64, 1995.

COSTA, A. S da; ARRIGONI-BLANK, M. F, BLANK, A. F; MENDONÇA, A. B de; AMÂNCIO, V. F; LEDO, A. da S. ***Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro***. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 68-72. 2007.

DUHEM, F.; MERCIER, N.; BOXUS, P. ***Difficulties in the establishment of axenic in vitro cultures of field collected coffee and cacao germplasm***. **Acta Horticulturae**, v. 225, p. 67-75, 1988.

GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant cell, tissue and organ culture:** fundamental methods. Germany: Springer, 1995. 359p.

GARCIA, E. V.; RAFAEL, M. Control de la oxidacion y contaminacion em microesquejes de café (*Coffea arabica* "Catimor") cultivados *in vitro.* **Agronomia Tropical**, v.40, p. 281-290, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 183-260.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminantes of plant-tissue and cell

cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.7, p. 452-469, 1991.

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.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

MORAES, A. M. de; ALMEIDA, F. A. C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.1. n.2, p.39-44. 2007.

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**, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003.

SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, 2 (2): 37 - 44, jul./dez.,2009.

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.

REED,B.M.; MENTZER,J.;TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.52, p. 67-70, 1998.

ROCHA, M.T.R. **Cultura de tecidos:** uma alternativa para a multiplicação dos gêneros *Anthurium* e *Caladium*. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

RODRIGUES, P.H.V. Estabelecimento *in vitro* de *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia agricola**, v. 62, n. 1, p. 69-71, 2005.

SILVA, R.M. dos S.; BLANK, M. de F.A.; ÂNGELO, P.C. da S. ***Desinfestação de explantes de inhame roxo (Dioscorea rotundata, Poir) coletados no campo para micropropagação***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. **Resumos…** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p.329.

SMITH, J. **Micro-propagation of the Gymea Lily**: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston: RIRDC, 2000. 59p.

SOUZA, T.V.; ABREU, M. F.; TARAZI, R.; DANTAS, A.C.M.; OLIVEIRA, V.L.; PEDROTTI, E.L. ***Controle de contaminantes na cultura de tecidos em macieira*** (*Mallus* spp). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. Resumos... Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p.346.

TANPRESERT, P; REED, B. Detection and identification of bacterial contaminants os strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 52, p. 53-55, 1998.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/index.htm

Acesso em: 10 de setembro de 2009.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Biotecnologia aplicada à produção de mudas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 3, n.19, 2001.