

**AGENTES DESINFESTANTES NO PROCESSO DE
MICROPROPAGAÇÃO DA AMORA PRETA (*RUBUS SSP*)**

**DISINFESTATION AGENTS IN THE MICROPROPAGATION
PROCESS OF BLACKBERRY (*RUBUS SSP*)**

RAFAELLY CALSAVARA MARTINS

Mestranda em Agronomia/ Horticultura – UNESP – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu (SP)
rcalsavara@yahoo.com.br

EMI RAINILDES LORENZETTI

Docente – Instituto Federal do Paraná – Campus Palmas – IFPR – Palmas (PR)
elorenzetti@gmail.com

FRANCISCO CÉSAR GONÇALVES

Docente - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba – IF -
Rio Pomba (MG)
cachico11@yahoo.com.br.

JOARA SECCHI CANDIAN

Doutoranda em Agronomia/ Horticultura – UNESP – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu (SP)
joara@live.com

NAYARA CRISTINA PEREIRA

Graduanda em Agroecologia/ Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus
Rio Pomba - IF - Rio Pomba (MG)
ifnayaracprp@gmail.com

Resumo: O objetivo foi desenvolver um protocolo eficiente para a desinfestação gemas de amoreira preta. Plantas jovens de amoreira forneceram os ramos para retirada das gemas. Esses ramos foram levados até ao laboratório para retirada das gemas. As gemas foram imersas em solução de etanol 70% por um minuto, depois em hipoclorito de sódio (NaClO), biguanida (PHMB) e dióxido de cloro (ClO₂) a 0%, 1%, 2% e 4% por quinze minutos. Após a assepsia as gemas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio Murashige Skoog (MS). O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições, 20 tubos/repetição. As variáveis observadas foram germinação e contaminação. Os resultados mostraram que tanto para contaminação quanto para a germinação, o agente hipoclorito de sódio obteve melhores resultados, sendo 2% a melhor concentração. O agente dióxido de cloro apresentou aumento da germinação dos explantes quando as concentrações foram crescentes.

Palavras-chave: Biotecnologia vegetal. Cultura de tecido vegetal. Desinfestação

Abstract: The objective of this work was to develop an efficient protocol for disinfections of black mulberry bud. Young mulberry plants provided branches for bud removal. These branches were taken to the laboratory for the buds to be removed. The buds were immersed in 70% ethanol solution for one minute, then in sodium hypochlorite (NaClO), biguanide (PHMB) and 0%, 1%, 2% and 4% chlorine dioxide (ClO₂) for fifteen minutes. After asepsis the buds were inoculated into test tubes containing Murashige Skoog (MS) medium. The design was completely randomized with three replicates, 20 tubes / replicate. The variables observed were germination and contamination. The results demonstrated that for both contamination and germination, sodium hypochlorite

showed better results, with 2% as the best concentration. Chlorine dioxide presented an increase in germination of explants as concentrations increased.

Keywords: Plant biotechnology. Plant tissue culture. Disinfestation

Introdução

A amora preta (*Rubus* ssp.) é cultivada em vários países de clima temperado devido a sua adaptação climática. No Brasil, houve um crescimento em área cultivada de frutas de clima temperado, conseqüentemente, a produção e consumo aumentaram. Isso ocorreu principalmente devido à modernização e adoção de novas tecnologias, associada com à melhor gestão das propriedades rurais (RETAMALES, 2011).

Outro fator importante que contribuiu para o avanço da cultura da amora preta foi o fato da mesma apresentar baixo custo de implantação, alta rusticidade, e principalmente a necessidade reduzida de agrotóxicos, sendo assim uma boa opção para o cultivo agroecológico e também uma opção de diversificação na agricultura familiar (ANTUNES et al,2010).

No Brasil, a cultura da amoreira encontra-se principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, sendo o principal estado produtor, devido o grande interesse pelo consumo associado à adaptação da cultura (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009). Entretanto, algumas regiões dos Estados de São Paulo e Minas Gerais também foram contempladas com a expansão da amora preta, isso devido ao microclima encontrado nessas regiões (SEGANTINI et al., 2011).

Segundo Caldwell (1984) a propagação da amoreira preta se faz na maioria das por meio de estacas de raízes. Podem também através de brotos (rebentos) originados das plantas cultivadas e estacas herbáceas (REZENDE, 1996). Diante disso, e crescente o cultivo *in vitro* de árvores frutíferas como um método de propagação vegetativa.

Diante disso, houve aumento em trabalhos envolvendo propagação da amoreira preta principalmente por micropropagação, que é considerada uma alternativa viável, pois promove plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em um curto espaço de tempo (ANTUNES, 2004). Segundo Grattapaglia; Machado (1990), em amoreira preta os explantes indicados para multiplicação clonal *in vitro* são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas que normalmente mantêm a fidelidade genotípica da planta matriz. Sendo assim, Otoni (1988) afirma que as características que vão compor os novos brotos, como tamanho, número médio e vigor dos brotos são influenciados pelo tipo, localização e pelo tamanho dos explantes utilizados na cultura.

Contudo, necessita-se de um eficiente protocolo de desinfestação para obter plantas saudáveis e alta produção, uma vez que o gênero *Rubus* é bastante responsivo *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2004). Já existem em literaturas vários trabalhos citando o agente desinfestante na amoreira, contudo tem que ser ressaltado que testar novos e observar os mais eficientes e importantes. Dentre as cultivares mais utilizadas de amoreira está a Tupy. Esta cultivar é resultado do cruzamento entre a cultivar “Uruguai” e “Comanche”, que foi desenvolvida pela Embrapa Clima Temperado em 1982 (SANTOS; RASEIRA, 1988). Tem como principal característica hábito de crescimento ereto, alto vigor, desempenho produtivo e apresenta em seus frutos um bom equilíbrio entre o açúcar e a acidez (GONÇALVEZ et al., 2011).

Objetivou-se desenvolver um protocolo de desinfestação de explantes de amoreira preta.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Departamento de Agricultura e Ambiente do Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais – Câmpus Rio Pomba, no laboratório Cultura de Tecidos Vegetais. Plantas jovens de amora-preta (*Rubus* ssp.) forneceram as gemas (explantes) que foram utilizadas no cultivo *in vitro* do experimento. As plantas para retirada das gemas foram coletadas em árvores de três anos de idade no Câmpus Rio Pomba no mês de agosto de 2015.

Foram testados três agentes desinfestantes Hipoclorito de sódio (NaClO), Biguanida (PHMB) e Dióxido de Cloro (ClO₂). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado constituído por uma testemunha e três tratamentos (0%, 1%, 2% e 4%), com três repetições, 20 tubos/ repetição. As variáveis observadas foram germinação e contaminação.

Os ramos de amora preta foram levados ao laboratório. Dos ramos foram retiradas as gemas. Para a desinfestação a bainha foi retirada e as gemas foram lavadas em água corrente com detergente neutro. Em condições assépticas, as gemas foram imersas em solução de etanol 70% por um minuto, depois em hipoclorito de sódio, biguanida e dióxido de cloro a 0%, 1%, 2% e 4% por quinze minutos.

Posteriormente as gemas foram inoculadas em tubo de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Todo procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O meio utilizado foi previamente autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Os tubos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz fluxo de fótons $\pm 50 \mu \text{ mol.s}$.

Os dados foram coletados após 30 dias da inoculação das gemas *in vitro*. Durante a coleta, foram consideradas plantas normais àquelas que possuíam dois pares de folhas e nenhuma contaminação, e anormais plantas que não desenvolveram e apresentavam contaminações, sendo de origem fúngica ou bacteriana. Os resultados das variáveis germinação e contaminação foram analisados pelo teste F ($p < 0,05$), nos casos de significância foi realizada análise de regressão através do software SISVAR.

Resultados e Discussão

Como já era esperado, a testemunha apresentou em todos os tubos de ensaio contaminações, e nenhuma germinação. Segundo Cassels (1991), essas contaminações geralmente são causadas por fungos e bactérias presentes na superfície dos tecidos vegetais. Assim como foram observados nos tubos empregados no experimento.

Essas contaminações podem também ser originárias de microrganismos endógenos. Esses contaminantes, especialmente bactérias, impõem consideráveis limitações ao desenvolvimento vegetal mesmo na fase de introdução *in vitro*. Para Souza et al (2006) quando a contaminação por microrganismos é exógena, a possibilidade de controle desses agentes contaminantes é simplificada através da aplicação de produtos. Porém, quando a contaminação é endógena, as consequências são limitantes, podendo acontecer perdas de tempo, material genético e recurso financeiro (Tabela 1).

Sendo assim, a Tabela 1 apresentou o comportamento das variáveis contaminação e germinação com o uso de concentrações de agentes desinfestantes, nota-se a resposta das gemas aos produtos em cada concentração testada. Logo, observou-se que tanto para variável contaminação e germinação, a concentração 0 (zero) apresentou os piores resultados, sendo 0% de germinação, como esperado. Esse resultado fortalece a importância do uso de agentes desinfestantes para o desenvolvimento do vegetal na fase *in vitro*. Nas demais concentrações, 1%, 2% e 4%, o Hipoclorito de Sódio apontou ser o melhor produto para desinfestação de gemas de amoreira. Tendo destaque a concentração 2%, na qual observou-se (24%) de contaminação e (76%) de germinação. Resultados semelhantes com os de Oliveira (2006), que utilizou

hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos em ponteiros de ramos recém-brotados em trabalho com multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira preta, obtendo, para cultivar Tupy, 17% de meristemas desenvolvidos.

Tabela 1. Contaminação e germinação de gemas de amoreira preta com o uso de concentrações de agentes desinfestantes

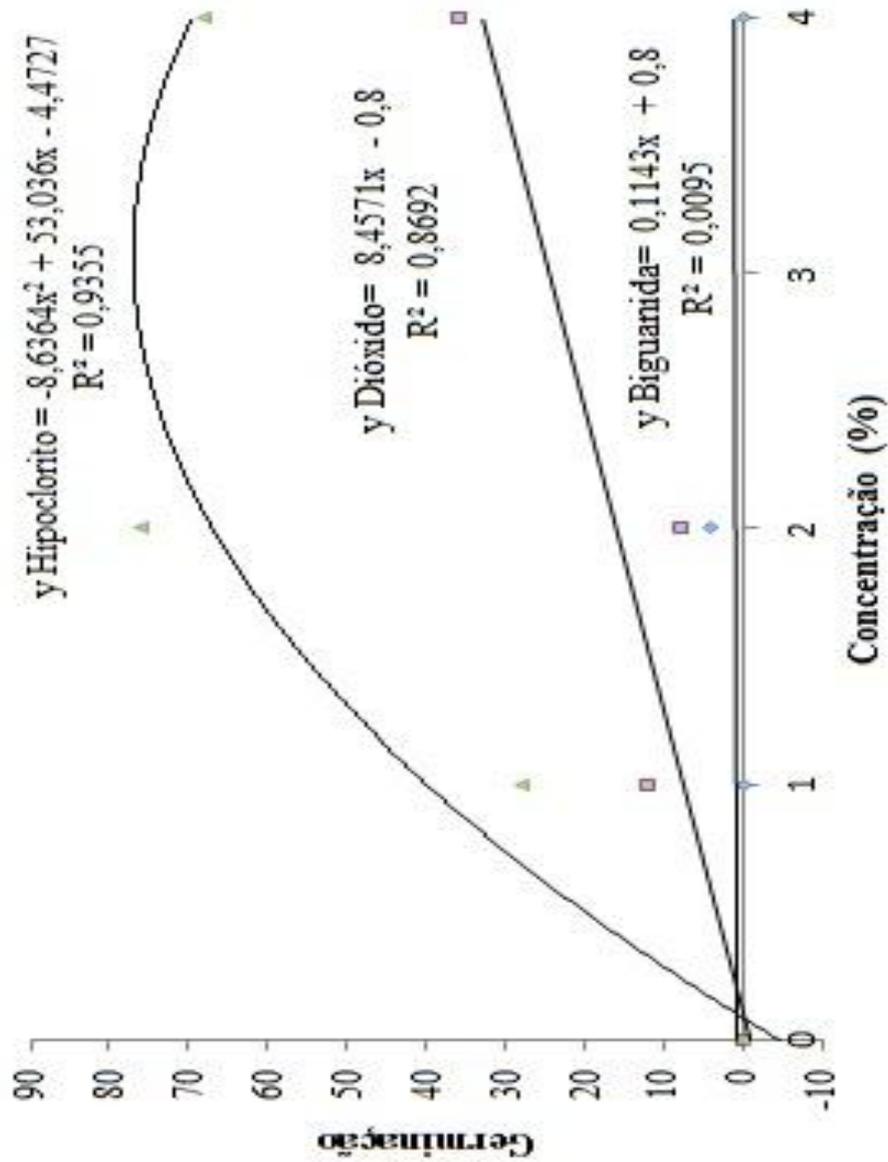
Contaminação	Concentrações (%)			
	0	1	2	4
Produtos	0	1	2	4
Hipoclorito de Sódio	100 a	72 b	24 b	32 c
Biguanida	100 a	100 a	96 a	100 a
Dióxido de Cloro	100 a	88 ab	80 a	64 b
Germinação				
Produtos	0	1	2	4
Hipoclorito de Sódio	0 a	28 a	76 a	68 a
Biguanida	0 a	0 b	4 b	0 c
Dióxido de Cloro	0 a	12 ab	8 b	36 b

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si (Tukey, $p > 0,05$).

Fonte: Elaboração dos autores.

Portanto, este estudo mostra com clareza que independente da origem dos contaminantes é indispensável à utilização de agentes desinfestantes no processo de assepsia da cultura da amora preta (Figura 1).

Figura 1. Germinação de gemas de amora preta em função da concentração de desinfestantes

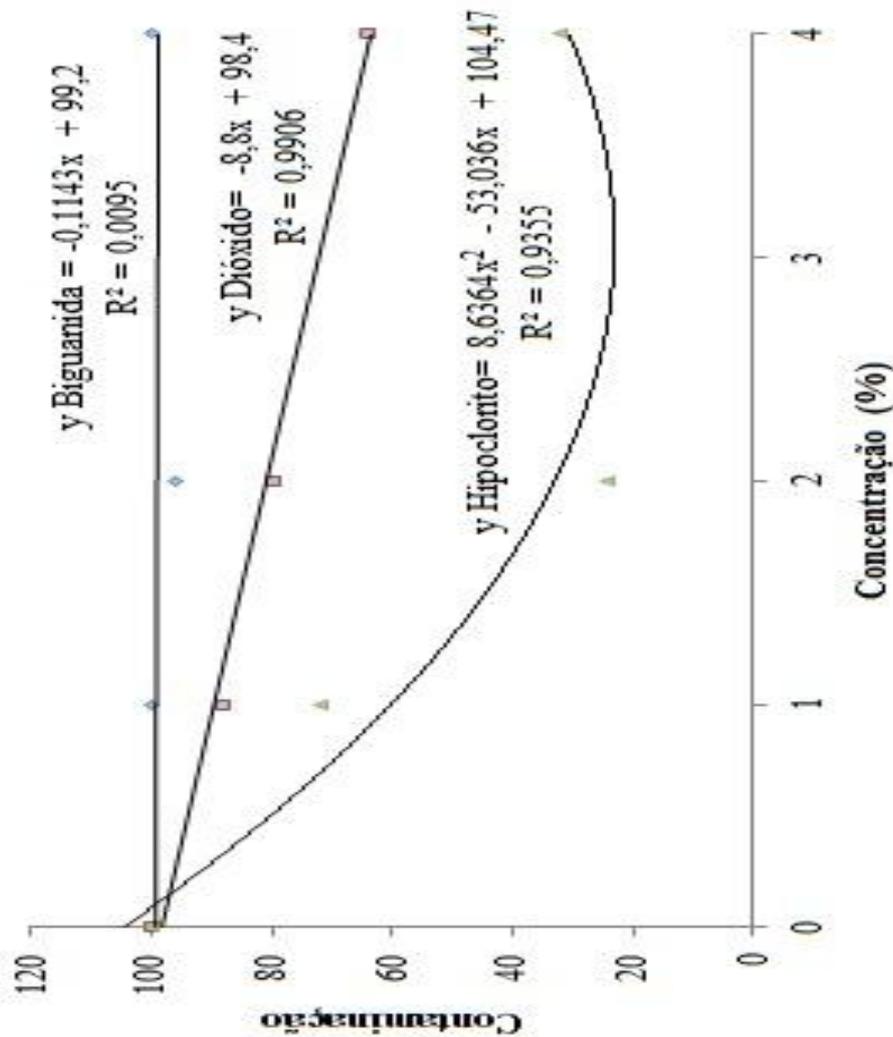


Fonte: Elaboração dos autores.

Para o hipoclorito de sódio o melhor modelo para as concentrações na germinação foi o quadrático. Para biguanida e dióxido de cloro os modelos ajustados foram lineares (Figura 1). Para o dióxido de cloro conforme foram crescentes as concentrações houve aumento da germinação de explantes. Porém, pelo fato do hipoclorito de sódio ser um produto de fácil acesso e de custo baixo, indica-se a utilização do mesmo ao invés do uso do dióxido de cloro.

Para o hipoclorito de sódio o melhor modelo para as concentrações na contaminação foi o quadrático. Para biguanida e dióxido de cloro os modelos ajustados foram lineares (Figura 2). Para o dióxido de cloro conforme foram decrescentes as concentrações houve aumento da contaminação de explantes.

Figura 2. Contaminação de explantes de amoreira preta em função da concentração de desinfestantes.



Fonte: Elaboração dos autores

Tanto para contaminação e germinação, o agente hipoclorito de sódio obteve melhores resultados (Figura 1 e 2). Para contaminação a concentração de 2% foi a que obteve melhores resultados (24%). Resultados parecidos aos estudos de Cid e Zimmermann (2006), que relataram que o uso de hipoclorito de sódio em doses e tempos de imersão corretos, pode ser eficiente para o controle da contaminação de explantes provenientes de campo. Diante disso, a combinação de concentração e tempo de exposição pode variar muito nos índices de contaminação de explantes, portanto, o ajustamento de um eficiente protocolo se faz necessário.

Para minimizar contaminação por microrganismos patogênicos, inúmeros protocolos para desinfestação vêm sendo testados por diversos autores. Diante disso, o hipoclorito de sódio vem destacando entre os compostos químicos mais utilizados. Além da utilização dos compostos químicos no processo de desinfestação, o uso de antibióticos adicionado em meio de cultura, vem apresentando grande eficiência no controle e erradicação de microrganismos patogênicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Palú et al (2011) em estudo com figueira (*Ficus carica* L.), ao utilizar 2,5% hipoclorito de sódio, apresentou resultado de 90% de explantes sobreviventes. Em trabalho realizado com desinfestação e estabelecimento de explantes de bananeira (*Musa* sp.), Pereira (2001) obteve resultados parecidos utilizando 2% de hipoclorito de sódio, o que permitiu o controle de contaminações e o desenvolvimento normal dos explantes. Oliveira (2006), em estudos com multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira-preta, utilizou-se 1% de hipoclorito de sódio por 10 minutos e obteve altas taxas de multiplicação para cultivar “Ébano”, seguido de “Tupy”, “Cherokee”, “Comanche”, “Xavant”, “Brazos” e “Guarani”, e com níveis mínimos de contaminações e oxidações de plantas.

Conclusão

O estudo apontou a fundamental importância do uso de agentes desinfestantes no controle de contaminantes no processo de assepsia de gemas da amoreira preta.

Em teste para verificar qual melhor produto, o Hipoclorito de Sódio obteve os melhores resultados, seguindo do Dióxido de Cloro e Biguanida.

Utilizando-se 2% de hipoclorito de sódio por 15 minutos reduziu-se a contaminação por fungos e bactérias em explantes de amoreira preta provenientes de campo.

O agente dióxido de cloro apresentou aumento da germinação dos explantes quando as concentrações foram crescentes.

Referências

- ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R. Fenologia e produção de cultivares de amoreira-preta em sistema agroecológico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p.1929-1933, 2010.
- ANTUNES, L.E.C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E.D. **Propagação, plantio e tratos culturais**. In: ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.do C.B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.37-42. 2004
- BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 183-260
- CALDWELL, J. D. Blackberry propagation. **HortScience**. Alexandria, v.19, n.2, p.193-195. 1984.
- CASSELS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: **Kluwer Academic**, p. 31-44, 1991.
- CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. **A contaminação in vitro de Plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.
- GONÇALVES, E.D. et al. **Implantação, manejo e pós-colheita da amoreira-preta**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2011. 5p.
- GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa, 1990. p.99-169.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n. 1, p. 437-496, 1962.
- OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V.. **Multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta**. Pelotas: Comunicado Técnico, 154, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/746018/1/comunicado154.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2016.
- OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 23 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 6).
- GPALÚ, E. G. et al. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p.587-592, 2011.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C.. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v., p.222-226, out. 2011.

RETAMALES, J. B. World temperate fruit production: characteristics and challenges. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p.121-130, 2011. Número Especial.

REZENDE, M. E. **Multiplicação *in vitro* de Kiwi cvs. ‘Hayward’ e ‘Matua’: influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH.** 1996. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

SANTOS, A.M. dos; RASEIRA, M. do C.B. **Lançamento de cultivares de amoreira-preta.** Pelotas: EMBRAPA – CNPFT, 1988. n. p. (EMBRAPA: Informativo 23).SOUZA, A.S.; et al. **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152p.

SCHAKER, P. D. C.; ANTONIOLLI, L. R. **Aspectos econômicos e tecnológicos em pós-colheita de amoras-pretas (*Rubus spp*).** Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v.15, n.1-4, p.11-15, 2009.

SEGANTINI, D. M. et al. **Uso de reguladores de crescimento para a superação da dormência e sua influência na brotação, no florescimento e na produção da amoreira-preta.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.33, p. 275-280, 2011.