

DESINFESTAÇÃO A BASE DE PPM® EM SEGMENTOS FOLIARES DE SERINGUEIRA (*Hevea spp.*), CULTIVADAS *IN VITRO*

Ana Claudia Lopes da Silva¹; Cândida Elisa Manfio²; João Ricardo Avelino Leão³; Josiane Celerino de Carvalho⁴; José Francisco de Carvalho de Gonçalves⁵; Andrea Raposo⁶

¹ Eng. Flo., Doutoranda PPG Ciências de Floresta Tropicais INPA; ² Eng. Agr., Pesquisadora EPAGRI; ³ Eng. Flo., Docente IFAC; ⁴ Doutoranda PPG Ciências de Floresta Tropicais INPA; ⁵ Coord. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal- INPA; ⁶ Pesq. Lab. de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Gado de Corte

Identificação do evento: VI Congresso Brasileiro de Heveicultura - 22 a 24 de outubro de 2019, Belo Horizonte /MG.

Resumo: O estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o uso do PPM® (Plant Preservative Mixture) na inibição de contaminações microbianas em segmentos foliares de seringueira, quando estes explantes forem submetidos a diferentes concentrações de 2,4D. Explantes de folhas jovens de seringueira foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) combinados com PPM®. O protocolo de desinfestação com o uso do PPM® foi eficaz para o controle de contaminações microbianas em segmentos foliares de seringueira (*Hevea spp.*) cultivados *in vitro*.

Palavra chaves: cultura de tecidos; 2,4-D, contaminações microbianas.

Introdução

Contaminações causadas por microrganismos tem sido um fator limitante na micropropagação de espécies lenhosas (PALÚ, 2011). Na micropropagação de *Hevea brasiliensis*, estabelecer uma cultura axênica e a não ocorrência de oxidações representam passos desafiadores (MORADPOUR et al., 2016). O uso do Plant Preservative Mixture® (PPM) tem sido uma das alternativas para tentar controlar contaminações microbianas. Por ser um biocida sintético que penetra na parede celular de micro-organismos e inibe diversas enzimas-chave do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadora de elétrons, o PPM® atua como um biocida de amplo espectro (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2019). Quando se trata da organogênese *in vitro* em *Hevea*, ainda não existe um protocolo que seja eficiente para a propagação de clones elites em larga escala. Os principais gargalos a serem resolvidos para esta espécie são hiperidricidade, oxidação e contaminação endógena (MÁXIMO et al., 2018). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o uso do PPM® na inibição de contaminação microbiana em segmentos foliares de seringueira, quando estes explantes forem submetidos a diferentes concentrações de 2,4D.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre. Nos experimentos de cultivo *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes, folhas jovens de seringueira recém expandidas e em boas condições fitossanitárias. Estas foram coletadas de árvores matrizes do clone FDR 5865 do banco de germoplasma do Campo Experimental da Embrapa Acre. Os segmentos foliares coletados (72 amostras) foram conduzidos ao laboratório e foi realizada pré-assepsia (lavagem em água corrente com detergente comercial neutro durante 10 minutos, seguidos de uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada). Após a pré-assepsia, na câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos durante 1 minuto em solução de álcool etílico a 70% (v/v) seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) com cinco gotas de detergente comercial neutro durante 20 minutos. Em seguida, passaram por uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, para eliminar o excesso de substâncias desinfestantes. Ao final foram imersos em solução antioxidante de PVP (polivinilpirrolidona) (1g L⁻¹), até o momento da inoculação. O material foi inoculado em frascos com a capacidade de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; mg L⁻¹) combinados com PPM® (Plant Preservative Mixture) (0,0; 1,0 ml L⁻¹). O pH foi ajustado em 5,8 antes da adição do agente gelificante ágar (6 g L⁻¹) e autoclavado a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação, foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz durante 30 dias, após este tempo foram transferidos para presença de luz por mais 30 dias. As avaliações foram realizadas após 30 e 60 dias de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, onde o fator A são diferentes concentrações de 2,4-D e o fator B concentrações de PPM®, perfazendo 8 tratamentos com 6 repetições. Cada repetição foi composta por um frasco contendo quatro explantes, totalizando 48 parcelas. As variáveis estudadas foram: sobrevivência, oxidação fenólica e contaminação microbiana. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados pelo teste de Tukey (5%). O programa utilizado foi Sisvar (Sistema para Análise de Variância) versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

Resultados e Discussão

Após 30 dias de incubação na ausência de luz, todos os tratamentos apresentaram oxidação nas bordas dos segmentos foliares. Assim, o estresse oxidativo é necessário para a indução no processo de desenvolvimento do explante, mas o excesso de compostos oxidantes desencadeia a oxidação dos fenóis, levando ao escurecimento e à senescência dos tecidos (JO *et al.*, 2014; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2015).

Aos 60 dias de cultivo, verificou-se alta taxa de sobrevivência dos explantes, cerca de 93% (Figura 1), apresentando efeito significativo apenas para o fator B na ausência e presença de PPM[®]. Já o fator A, que corresponde a diferentes concentrações de 2,4-D, não teve efeito significativo assim como na interação entre estes dois fatores.

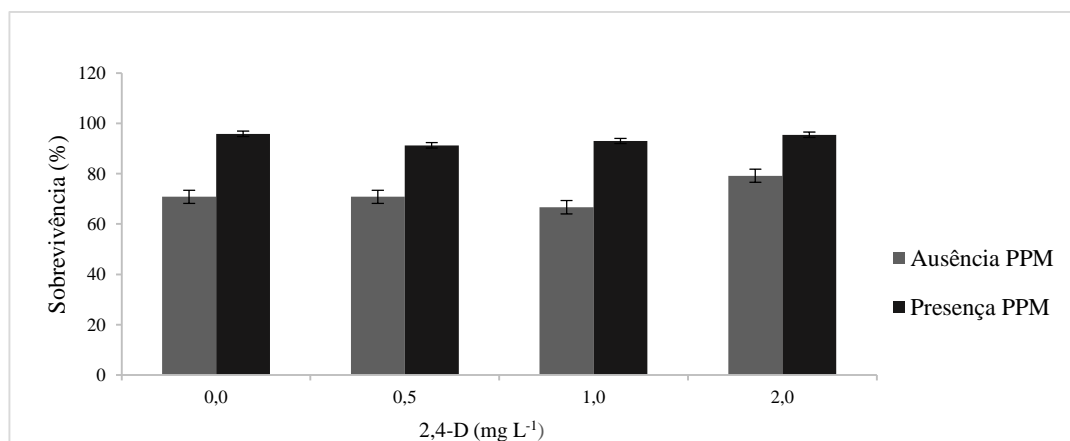


Figura 1. Porcentagem de sobrevivência em segmentos foliares de seringueira (*Hevea* spp.) introduzidas *in vitro*.

Estudos realizados com segmentos nodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), visando um protocolo de desinfestação do material vegetativo para o cultivo *in vitro*, utilizando as mesmas concentrações de PPM[®] descritas no presente trabalho, observaram taxas de sobrevivência de até 98% quando adicionado ao meio de cultura, sendo eficaz para o controle da contaminação (DUTRA *et al.*, 2008). Por outro lado, proporcionou altas taxas de oxidação, apresentando efeito fitotóxico para a cultura.

As oxidações fenólicas apresentaram diferenças significativas apenas para o fator B (uso do PPM[®]), onde a média de oxidação em todos os tratamentos foi de 93% na presença desta substância. O fator A (concentrações de 2,4-D) não teve efeito significativo assim como a interação entre estes dois fatores. Mesmo não havendo estatisticamente diferença significativa entre eles, conforme pode ser observado na figura 2, verificou-se que o uso do PPM[®] proporcionou uma maior porcentagem de oxidação fenólica no material vegetativo estudado.

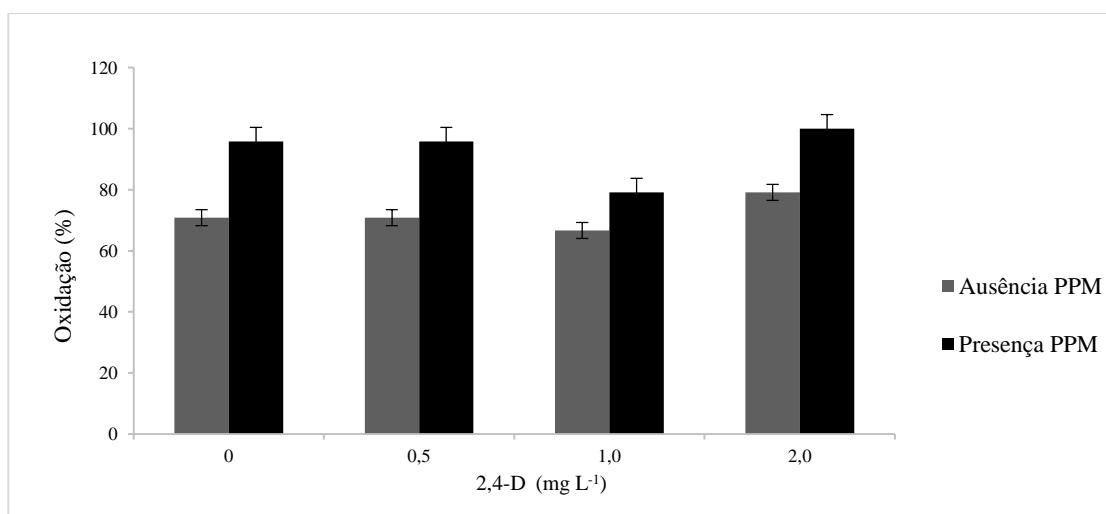


Figura 2. Porcentagem de oxidação em segmentos foliares de seringueira (*Hevea* spp.) introduzidas *in vitro*.

A oxidação é um dos problemas mais frequentes no cultivo *in vitro*, especialmente na fase de estabelecimento do cultivo de espécies lenhosas (SATO *et al.*, 2001). A exsudação de compostos fenólicos causa escurecimento e necrose

dos tecidos que sofreram algum tipo de injúria, após o ferimento surge formação de quinonas (substância fitotóxica) em função da ação de enzimas polifenases com os compostos fenólicos, limitando a absorção dos componentes do meio de cultura e o desenvolvimento da planta (AZOFEIFA, 2009; MUDOI et al., 2014).

Avaliando as contaminações microbianas, a interação dos fatores concentrações de 2,4-D e presença 1 ml L⁻¹ de PPM[®] no meio de cultura aliado ao procedimento de desinfestação empregado durante a fase de manipulação dos explantes, contribuíram para a redução da contaminação microbiana. Onde mostrou-se eficiência no controle de contaminação bacteriana, sem contaminação em todos os tratamentos empregados neste estudo. Apesar de apresentar baixo índice de contaminação fúngica onde a média entre todos os tratamentos testados foi de 23% (dados não apresentados). A presença 1 ml L⁻¹ de PPM[®] aliado as concentrações de 2 e 4 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultura apresentou efeito significativo no controle de contaminação fúngica, conforme pode ser observado na figura 3.

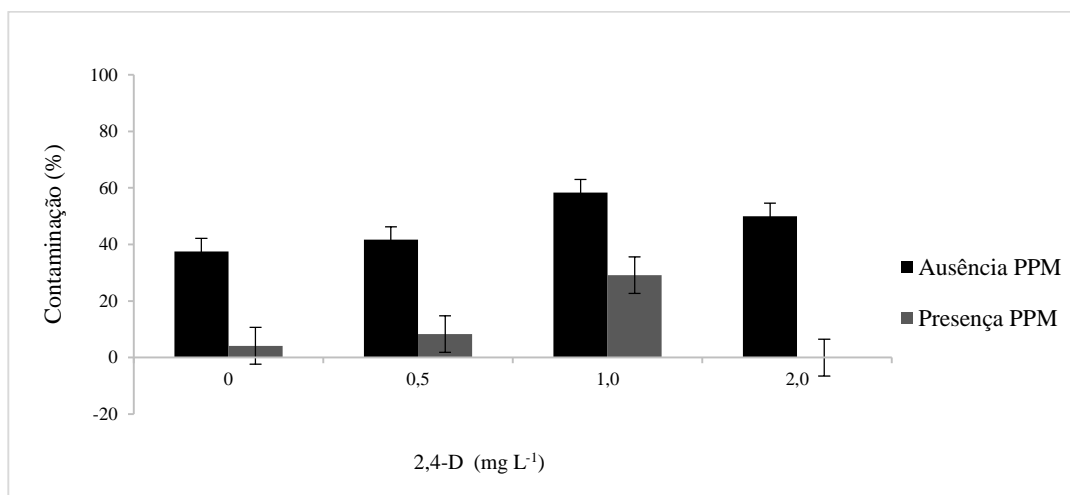


Figura 3. Porcentagem de contaminação em segmentos foliares de seringueira (*Hevea* spp.) introduzidas *in vitro*.

Contaminações são obstáculos à cultura de tecidos de espécies lenhosas, merecendo atenção especial. É importante destacar que muitos contaminantes apareceram após algumas semanas de cultivo, o que indica a possível presença de microrganismos endofíticos nos tecidos (PALU, 2011). Para contornar esse problema, o uso do PPM[®] tem sido satisfatório na eliminação dos contaminantes em várias espécies na cultura de tecidos vegetais.

Estudos realizados com segmentos nodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), visando um protocolo de desinfestação do material vegetativo para o cultivo *in vitro*, utilizando as mesmas concentrações de PPM[®] descritas no presente trabalho, observaram taxas de sobrevivência de até 98% quando adicionado ao meio de cultura, sendo eficaz para o controle da contaminação (DUTRA *et al.*, 2008). Por outro lado, proporcionou altas taxas de oxidação, apresentando efeito fitotóxico para a cultura.

Conclusão

O protocolo de desinfestação com o uso do PPM[®] foi eficaz para o controle de contaminações microbianas em segmentos foliares de seringueira (*Hevea* spp.) cultivados *in vitro*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Acre pelo suporte financeiro, tornando possível a execução desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

AZOFEIFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. **Agronomía Mesoamericana**, v.20, p. 153-175, 2009.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. Introdução ao cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Colombo: Embrapa Florestas**, (Embrapa Florestas. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 38), 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p. 109-112, 2014.

- JO, L.; SANTOS, A. L.; BUENO, C. A.; BARBOSA, H. R.; FLOH, E. I. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. **Tree Physiol**, v.34, p. 94–104, 2014.
- MÁXIMO, W. P. F. *et al.* *In vitro* multiplication of eucalyptus hybrid via temporary immersion bioreactor: culture media and cytokinin effects. **Crop. Breed. Appl. Biotechnol.** v.18, p.131–138, 2018.
- MORADPOUR, M.; AZIZ, M. A.; ABDULLAH, S. N. A. E. Stablistment of *in vitro* Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*) from Field-derived Explants: Effective Role of Silver Nanoparticles in Reducing Contamination and Browning. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v.7, p. 3, 2016.
- MUDOI, K. D.; SAIKIA, S. P.; BORTHAKUR, M. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro. **African Journal of Biotechnology**, v.19, p.1961-1972, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- PALÚ, E. G. *et al.* Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p. 587-592, 2011.
- PLANT CELL TECHNOLOGY 2019. PPM- plant preservative mixture product information. Disponível em <http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information> (Acessada em 05/07/2019).
- SATO, A. Y. *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, p. 117-123, 2001.
- WICKRAMASURIYA, A. M.; DUNWELL, J. M. Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis *in vitro*. **BMC Genomics**, v.16, p. 301, 2015.