

Efeito do benomyl e do bicloreto de mercúrio na desinfestação de explantes de palma forrageira (*Opuntia ficus*)

Silva Junior, Jessé Marques¹; Paiva, Renato²; Silva, Luciano Coutinho³; Masetto, Tathiana Elisa⁴; Martinotto, Cristiano⁵.

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista CNPq, e-mail: jesseagronomo@yahoo.com.br, ²Professor Associado, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Depto. de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, e-mail: renpaiva@ufla.br, fone (35) 3829-1786; ³Graduando em Agronomia; ⁴Doutoranda em Engenharia Florestal (UFLA), bolsista CAPES; ⁵Doutorando em Fisiologia Vegetal (UFLA).

INTRODUÇÃO

A palma forrageira (*Opuntia ficus*) é o alimento mais utilizado pelos produtores na maior Bacia Leiteira do Nordeste em Batalha-Alagoas, principalmente na época do verão. É o único volumoso que mantém seu valor nutritivo mesmo sem parar de crescer (Melo, 2005). Somente em Alagoas, existem mais de 90 mil hectares de palma forrageira miúda. Estima-se existir, no Nordeste brasileiro, cerca de 400 mil hectares cultivados, constituindo-se numa das principais forrageiras na época seca (Santos et al., 1997).

Atualmente, este vegetal se presta às mais diversas utilidades, por ser amplamente difundido, de fácil plantio e altamente resistente à seca. A palma forrageira é uma das principais culturas ornamentais da região Nordeste do Brasil e é principalmente utilizada na indústria alimentícia, na indústria farmacêutica e de cosméticos, além de ser empregada no setor agrônomico entre outros (Sebrae, 2001).

A cultura de tecidos é um meio de desenvolver células ou tecidos vegetais sob condições controladas. Pode ser definida como a cultura de células vegetais isoladas, de um grupo de células, tecidos ou órgãos em ambiente artificial, sob condições assépticas. Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram numa planta inteira (Da Silva, 2007).

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 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)

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 e sobrevivência de explantes de palma forrageira.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foram raquetes (cladódios) jovens de palma forrageira coletada no campus do Centro de Ciências Agrárias (CECA), da Universidade Federal de Alagoas, localizada no Município de Messias-Alagoas, Brasil. Após a coleta, o material foi levado ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG) para os procedimentos de assepsia, primeiramente com a imersão dos cladódios em etanol 70% (0 e 2 minutos), para quebrar a tensão superficial do tecido e facilitar a penetração do bicloreto de mercúrio (HgCl₂) 0,1% (0, 5, 10, 20 e 30 minutos) e benomyl 0,1%, totalizando 12 tratamentos. Ao término da assepsia foram efetuadas cinco lavagens. Todo o procedimento de limpeza (assepsia) foi realizado em cabine de fluxo laminar. As combinações dos tratamentos podem ser verificadas na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos e tempo de imersão utilizados durante a assepsia.

Tratamentos	Etanol 50% (min.)	Biocloreto de mercúrio 0,1% (min.)	Benomyl 0,1% (min)
T1	0	0	0
T2	0	5	5
T3	0	10	10
T4	0	15	15
T5	0	20	20
T6	0	30	30
T7	2	0	0
T8	2	5	5
T9	2	10	10
T10	2	15	15
T11	2	20	20
T12	2	30	30

Os cladódios foram seccionados em fragmentos de 1 cm de comprimento, os quais receberam o nome de explantes, e os mesmos foram inoculados em meio de cultura universalmente conhecido por MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com sacarose (30g L^{-1}), ágar ($7,0\text{g L}^{-1}$), pH ajustado para 5,8 sem regulador de crescimento e a cultura foi encubada em sala de crescimentos com $27\pm 2^\circ\text{C}$, 16 horas de fotoperíodo a $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa por 20 dias. Neste período foram avaliados a taxa de contaminação e o número de explantes estabelecidos *in vitro*.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 12 tratamentos e unidade experimental constituída de quinze 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 Tukey a 5%.

RESULTADOS E DICUSSÃO

Com base nos resultados observados na Figura 1, pode-se considerar que as soluções desinfestantes testadas, com exceção da testemunha (T1), foram eficientes no decorrer das quatro semanas de avaliações, devido a redução de contaminações fúngicas e bacterianas. Após a desinfestação a maioria dos explantes de palma (70%), se desenvolveram formando brotações, porém 30% apresentaram sintomas de toxidez na porção basal como: escurecimento (necrose) e dobramento (curvatura), a partir do T6.

O melhor tratamento observado para desinfestação de explantes de palma forrageira foi T5 com redução de 83%, 82%, 81% e 78% das contaminações nas quatro semanas de cultivo. Flores et al. (2006), utilizando soluções de biocloreto de

mercúrio (0,1%) e benomyl (0,1%) na otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* conseguiu resultados satisfatórios com tempos de imersão a partir de 5 minutos em ambas as soluções, alcançando valores próximos a 100% de descontaminação. Andrade (1998), trabalhando com desinfestação de embriões imaturos de *Coffea* sp. utilizou biocloreto de mercúrio (0,5%), proporcionou 100% de embriões assépticos.

A partir do tratamento T6, onde se observaram sintomas de toxidez, constatou-se também a morte dos explantes provavelmente provocada pelo biocloreto de mercúrio.

Apesar de o $HgCl_2$ ser bastante utilizado em espécies com sérios problemas de contaminações George (1993) relata que este produto é extremamente tóxico se utilizado por longos períodos, devendo ser manuseado com muita cautela.

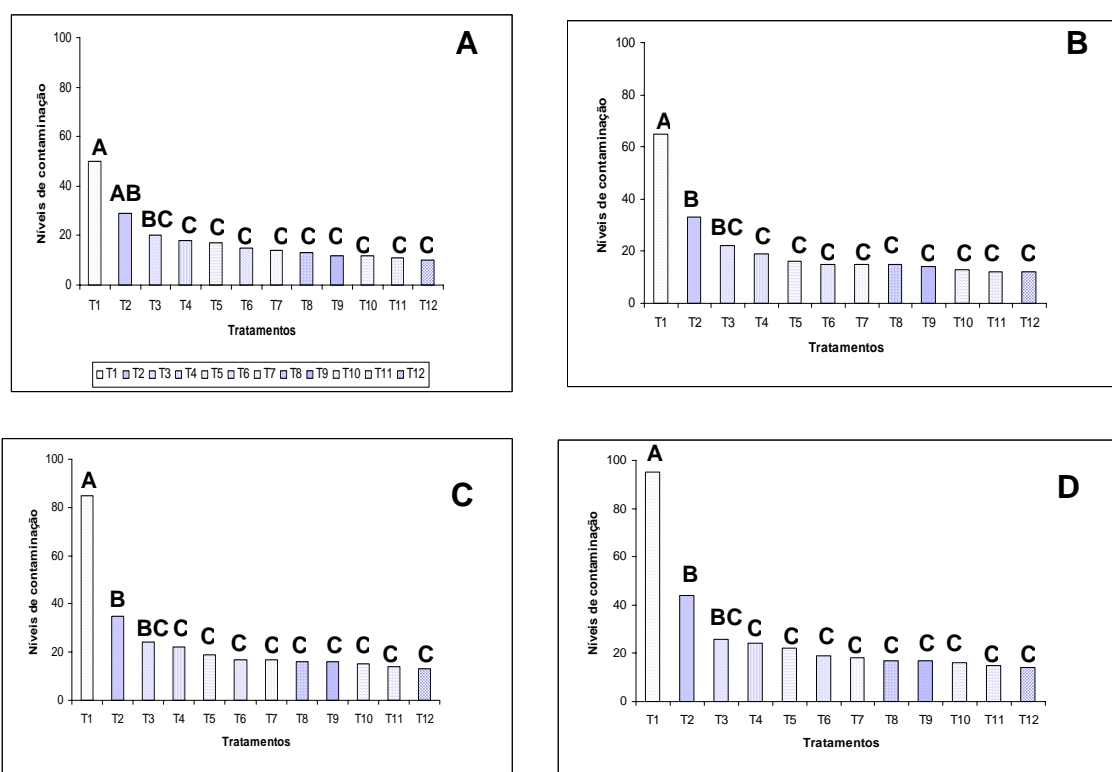


Figura 1. Eficiência dos tratamentos no decorrer de 4 semanas. A- primeira semana; B- segunda semana; C- Terceira semana e D- quarta semana

O percentual de sobrevivência de explantes de palma forrageira em relação ao tempo e a solução asséptica utilizada podem ser observados na Figura 2. Onde se verifica que o melhor tratamento foi T5 com 98% de sobrevivência, seguido pelo T3 e T4 com 66% e 79% de sobrevivência. Para a testemunha (T1), as mortes foram ocasionadas pelo desenvolvimento de contaminações tanto fúngicas quanto bacterianas.

Nos tratamentos que excederam períodos superiores a 20 minutos de imersão em biocloreto de mercúrio e benomyl, com a adição de etanol (50%) por dois minutos, se tornaram extremantes letais aos explantes, como podem ser observados nos tratamentos T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12, com 35%, 30%, 21%, 20%, 15%, 12% e 5% de sobrevivência.

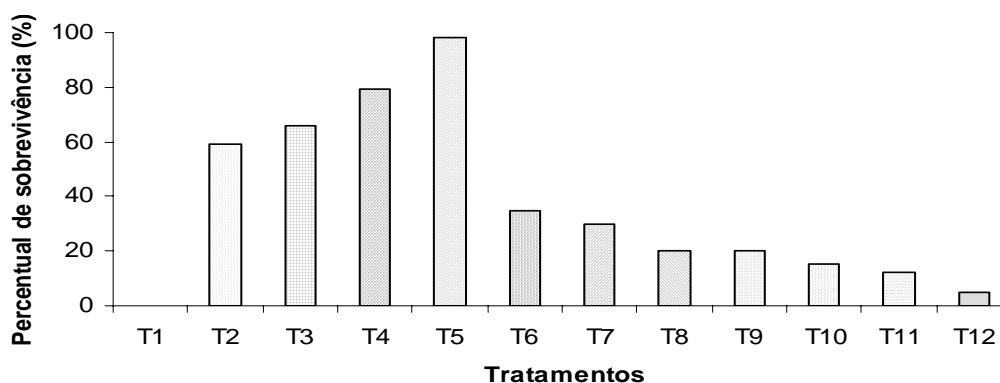


Figura 2. Percentual de sobrevivência de explantes de palma forrageira após 30 dia de cultivo.

CONCLUSÃO

O melhor tratamento para desinfestação de explantes de palma forrageira proveniente do campo foi o T5 (20 minutos em biocloreto de mercúrio e 20 minutos em benomyl), o qual proporcionou 98% de sobrevivência.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. M. C. O. 1998. Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro. Lavras: UFLA. 86p. Dissertação de mestrado.

DA SILVA, A. L. C. Cultura de tecidos de plantas. Disponível em: <http://br.geocities.com/alccoelho/calogenese.html>. Acesso em: 02 abr. 2007.

FLORES, R.; MALDANER, J. & NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hichen. Ciência Rural, Santa Maria, v.63, n.3, p, 845-851, mai-jun, 2006.

GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture.** The technology. Eversley. Exegetics, v.1, 1993.

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.

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

SEBRAE- AGROECOLOGIA, CULTIVO E USOS DA PALMA FORRAGEIRA. Sebrae – PB, 2001.

PALAVRAS-CHAVE:

Opuntia ficus, assepsia, estabelecimento *in vitro*, contaminação.