



Avaliação de Processo de Desinfestação de Explantes Foliare *in vitro* de Híbridos de Morango para Aquisição de Protocolo

Warley Rafael Oliva Brandão, Izabela Cristina Pires Gomes, LUCIANA NOGUEIRA LONDE, Nayara de Souza Damascena, ANNANDA MENDES COSTA, Emanuelle Ferreira Melo, Emerson Brito Riberio

Introdução

O morango (*Fragaria x ananassa*Duch) é a espécie de maior expressão econômica do grupo das pequenas frutas, apresentando produção mundial de 3,1 milhões de toneladas Oliveira [1], entretanto por ser uma cultura sensível, tem-se encontrado dificuldades na obtenção de mudas com qualidade.

A cultura de tecidos é definida como o conjunto de técnicas capazes de desenvolver células, tecidos ou órgãos vegetais utilizando soluções nutrientes em um ambiente que exige ser asséptico e controlado, isolados da planta-mãe. A assepsia adequada do ambiente promoverá o desenvolvimento saudável dos explantes minorizando as chances de contaminação. Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram em uma planta inteira. O uso das técnicas de cultura permite reduzir o tempo de produção de cultivares, auxilia no melhoramento genético convencional e pode ser considerada uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas de interesse comercial ou farmacológico Sado [2]

Os calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogênicos *in vitro* Rodrigues [3]. Além disso, os calos são importante na engenharia genética, durante o processo de transformação gênica, para geração de plantas transgênicas

Assim, objetivou-se com o trabalho desenvolver um protocolo de desinfestação para micropropagação de calos de híbridos de morangueiro desenvolvidos na EPAMIG a partir de explantes foliares, a fim de serem utilizados em futuros programas de melhoramento.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada em Nova Porteirinha, Minas Gerais. Quatro híbridos de morango: Aleluia x Toyonoka 153 (AL X TO 153), Oso Grande x Toyonoka 55 (OG X TO 55), Toyonoka x Sweet Charlie 13 (TO X SC 13), Camino Real x Sweet Charlie 9 (CR X SC 9) desenvolvidos pela EPAMIG, Unidade Regional Norte de Minas, localizada no município de Nova Porteirinha (MG), foram utilizados como explantes, mais especificamente, o tecido foliar sem a nervura central. O protocolo de desinfestação testado consistiu em imersão em estreptomicina(0,6 g/L) e Derosal(100 mg L⁻¹) por 25 minutos, em álcool puro por 1 minuto, em lisoforme (formaldeído) por 7 minutos e em água sanitária (2,5% de cloro ativo), com 2 gotas de Tween 20 por 25 minutos sobre agitação constante, após cada imersão foi feita a tríplex lavagem com água destilada autoclavada.

Para a indução de calos foi realizado um ensaio inicial, com objetivo de verificar a capacidade de produzir calos nos híbridos estudados. As folhas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura básico MS Murashige e Skoog [4], suplementados com diferentes hormônios. O material foi cultivado em tubos de ensaio e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Foi utilizado um explante por tubo de ensaio contendo meio de cultura mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25° C ± 1 e fotoperíodo de 16 horas.

Cada explante foi colocado individualmente em tubos de ensaio em contato com o meio de cultura. Foi utilizado um explante por tubo, num total de 55 tubos. Após 30 dias foram avaliados a ausência ou presença de explantes com calo, e se houve contaminação e oxidação desses explantes.

Resultados e Discussão

Observou-se que 30 dias após o estabelecimento *in vitro*, os explantes iniciaram a formação de calos. Os híbridos AL x TO 153, OG x TO 55 e TO x SC 13 apresentaram calos compactos com coloração verde. Segundo Sado [2], os calos compactos geralmente apresentam cor verde intensa ou brancas, apresentando superfície com aspecto aveludado, sendo calos muito resistentes ao corte e podendo ser considerados como massa celular compacta.

O híbrido OG x TO 55, foi o que apresentou maior porcentagem de calos oxidados (16,36%), que segundo Santos



[5], os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem liberar exudatos que tornam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes. Ferimentos normalmente provocam oxidação, sendo que discos foliares apresentam maior oxidação do que segmentos nodais por sofrerem ferimentos em maior área. Os calos oxidados foram utilizados em subcultivos posteriores e apresentaram capacidade regenerativa.

Apenas o híbrido CR x SC 9, apresentou calos contaminados (9,09%), sendo esses descartado (Tabela 1). Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, eliminando no meio metabólitos tóxicos, podendo ocasionar a morte da plântula Pereira [6].

Conclusão

O protocolo de desinfestação para micropropagação de calos de híbridos de morangueiro a partir de explantes foliares, foi eficiente devida a pequena quantidade de explantes contaminados observados, podendo assim ser utilizado em futuros programas de melhoramento.

Agradecimentos

Os autores agradecem a EPAMIG por ceder suas dependências para a concretização desse trabalho e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fomento ao desenvolvimento científico e tecnológico e concessão da bolsa de estudo de graduação.

Referências

- [1] OLIVEIRA, R. P.; SCHIVITTARO, W. B.; WREGE, M. S.; UENO, B.; CASTRO, L. A. S. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO NACIONAL DE MUDAS DE MORANGUEIRO. PELOTAS: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2006. 28 P. (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. DOCUMENTOS, 162).
- [2] SADO, M. EFEITO DO 2,4-D NA CALOGÊNESE DE SENNA SPECTABILIS (DC) IRWIN ET BARN (LEGUMINOSAE) E SEUS COMPOSTOS DE RESERVA. 2009. 90P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE). INSTITUTO DE BOTÂNICA DA SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE. SÃO PAULO, 2009.
- [3] RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. CALOGÊNESE EM *CISSUSSYOIDES* L. A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES VISANDO À PRODUÇÃO DE METABÓLITOS *IN VITRO*. REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, BOTUCATU, v.12, N.3, p.333-340, 2010.
- [4] MURASHIGE, T. E SKOOG, F. A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, v.15, p.473-497, 1962.
- [5] SANTOS, R. B.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F., 2001; PROBLEMAS NO CULTIVO *IN VITRO*: CULTURA DE TECIDOS. PAIVA E PAIVA, UFLA, LAVRAS, M.G. 9:73-79.
- [6] PEREIRA, E.; MATTOS, M.; FORTES, G. IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE COM ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CONTAMINANTES E EXPLANTES DE BATATA MICROPROPAGADOS. PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA. v.38, p. 827-834, 2003.



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:
Unimontes
Universidade Estadual de Montes Claros

APOIO:
FAPEMIG

FADENOR

24 a 27 setembro
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Tabela 1. Porcentagem de calos compactos, oxidados e contaminados, provenientes de explantes foliares de híbridos de morango em meio MS.

Tipos de calos	Híbridos (%)			
	AL x TO 153	CR x SC 9	OG X TO 55	TO x SC 13
Compactos	25,45	0	9,09	18,18
Oxidados	5,45	10,91	16,36	5,45
Contaminados	0	9,09	0	0