MICROPROPAGAÇÃO DE *Celtis* sp: CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO E OXIDAÇÃO

Aurora Yoshiko Sato[1], Herly Carlos Teixeira Dias[1], Leonaldo Alves de Andrade[2]; Vênia Camello de Souza[2].

RESUMO: A cultura de tecidos oferece grande potencial para o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas com importância econômico-ecológico. O *Celtis* sp ou "juazeiro-de-bode" é uma planta do nordeste semi-árido brasileiro, muito utilizada na produção de forragens durante as longas estiagens. Pouco se conhece sobre sua reprodução e a micropropagação seria uma das alternativas a serem estudadas. A oxidação e a contaminação são os principais problemas no estabelecimento *in vitro* de grande parte das plantas. Com o objetivo de estudar metodologias de estabelecimento *in vitro* do *Celtis* sp realizaram-se os seguintes experimentos: a) segmentos nodais sob efeito de lavagens em água; b) gemas sob efeito de Benlate e c) gemas apicais e laterais tratadas com diferentes concentrações de Benlate. O *Celtis* sp não apresentou facilidade à oxidação; as lavagens em água favoreceram a disseminação de fungos; o Benlate na concentração de 200mgL^{-1} inibiu o crescimento de fungos sem causar fitotoxidez aos explantes e a desinfestação com Benlate, além de diminuir a contaminação, não foi fitotóxica.

Palavras-chave: Espécies nativas, cultura de tecidos, compostos fenólicos, microoganismos.

Celtis sp MICROPROPAGATION: CONTAMINATION AND OXIDATION CONTROL

***ABSTRACT**: Tissue culture presents great potential for the establishment of native species* in vitro*, which have economic-ecological importance. The* Celtis *sp or "juazeiro-de-bode" is a semi-arid plant from Northeastern Brazil used as forage during the long dry season. Not much is known about its reproduction, and the micropropagation may represent one alternative for its propagation. The oxidation and contamination are the main problems in establishment,* in vitro*, of any part of plants. For studying the* in vitro *establishment of* Celtis *sp the following experiments were done: a) nodal cutting obtained in water, b) shoots dipped in benlate and c) apical and lateral shoots treated with benlate at different concentration. The* Celtis *sp exhibited resistance to oxidation; the washing in water favored the fungi infection; cuttings treated in benlate at 200mgL^{-1} concentration inhibited the fungi growth, without causing phytotoxic effect.*

Key words: Native species, tissue culture, phenolic compounds, microorganisms.

[1] Departamento de Engenharia Florestal; CCA/UFV; Viçosa, MG; 36570-000, herly@solos.ufv.br
[2] Departamento de Fitotecnia; CCA/UFPB; Areia-PB; 58397-000; landrade@cca.ufpb.br

1. INTRODUÇÃO

O *Celtis* sp, conhecido vulgarmente no nordeste brasileiro como "juazeiro-de-bode", "mama-de-cabra", "juá-miúdo", dentre outros, é pertencente à família das Ulmáceas. É um arbusto ou árvore pequena, de pouco diâmetro, com espinhos solitários ou geminados, retos ou curvos, finos e agudos, folhas alternas, simples ovadas e elípticas. O fruto é uma drupa globosa de cor laranja, sabor adocicado e comestível (Corrêa Filho, 1984). Essa espécie, particularmente no semi-árido, chama a atenção pelo seu potencial forrageiro, sobretudo para caprinos, além de apresentar grande resistência à seca, produzindo biomassa, mesmo no período de maior déficit hídrico. A conservação de componentes de diversidade biológica é vital na zona semi-árida, onde recursos naturais são escassos. Dessa maneira, essa espécie detem grande relevância ambiental, econômica e social (Andrade, 1998).

Segundo Abedini et al. (2000), a espécie *Celtis tala* Gill. Ex Planch normalmente é regenerada por sementes, possuindo alta mortalidade no estádio de plântula, não encontrando-se bibliografias com dados de porcentagem de germinação ou de métodos alternativos de propagação vegetativa. Além disso, as sementes apresentam dormência tegumentar que, apesar de ser um mecanismo de sobrevivência da espécie, é uma desvantagem quando o objetivo é a mutiplicação em curto espaço de tempo. No Brasil, não são encontrados trabalhos com esta espécie.

A necessidade de reposição de espécies nativas com potencial econômico-ecológico é amplamente reconhecida, embora a participação de espécies autóctones no sistema de produção florestal seja ainda pequena. De acordo com Kanashiro (1992), antes dessas espécies atingirem seu potencial econômico, sua propagação precisa ser desenvolvida, com a biotecnologia podendo auxiliar em seus diversos aspectos como cultura de tecidos, clonagem e engenharia genética.

Entretanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas, tais como oxidação e contaminação.

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente de essências nativas, especialmente das tropicais, que contêm alta concentração desses componentes (George & Sherrington, 1984). Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998; Guerra, 1989). Uma das possibilidades técnicas para reduzir esse problema inclui a lavagem, em água corrente, dos explantes coletados antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação de compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1998). A contaminação depende do material vegetal utilizado para isolamento *in vitro*, que pode ser de casa de vegetação ou do campo. No caso de espécies florestais nativas, o material vegetal é retirado do campo contendo elevada concentração de microrganismos.

O Benomil ou Benomyl, o primeiro fungicida sistêmico desenvolvido, possui atividades preventivas, curativas e sistêmicas contra numerosos grupos de fungos. Apresenta, ainda, baixa toxicidade e, de modo geral, não provoca fitotoxicidades. No Brasil, existem duas marcas comerciais (Benlate 500 e Benomil Nortox), ambas contendo $500 gkg^{-1}$ de Benomil. No momento, apenas Benlate 500 está disponível comercialmente (Picinini,1994). O Benomil tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal em várias concentrações, de 50 mgL^{-1} (Hauptmann et al.,1985) a 0,6 gL^{-1} (Yang, 1976) de Benomil.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi determinar metodologias de estabelecimento *in vitro* do *Celtis* sp com controle de oxidação e contaminação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estabelecimento de segmentos nodais de *Celtis* sp sob efeito do tempo de lavagem em água

Coletaram-se ramos de *Celtis* sp provenientes de poda em árvores localizadas no Campus III da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. Este material foi transferido para o Laboratório de Fitopatologia, onde foi lavado e feita a toalete, que consistiu na retira das folhas separando-se segmentos nodais de aproximadamente 0,3 cm. A seguir, seccionaram-se segmentos contendo, em média, três gemas, tratados em solução com 200 mgL^{-1} de Benlate (Benlate500, equivalente a 500gkg^{-1} de Benomil), durante 20 minutos e, posteriormente, lavados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (a testemunha; uma lavagem por 15 minutos; duas lavagens a cada 15 minutos; três lavagens a cada 15 minutos e quatro lavagens a cada 15 minutos) e nove repetições. Após cada tratamento, os explantes foram lavados por 15 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio 20% mais três gotas de detergente por 15 minutos. Após a desinfestação os explantes foram lavados por três vezes em água destilada e esterilizada. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram seccionados em segmentos de aproximadamente 1 cm contendo uma gema e inoculados no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) sem regulador de crescimento, acrescido 6 gL^{-1} de agar, pH ajustado para 6 e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento a ± 26ºC sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2.000 lux (36 $mol.m^{-2}.s^{-1}$).

Após cinco dias da inoculação, avaliaram-se o número de plantas oxidadas, contaminação por bactérias e por fungos. Os tempos de lavagem foram submetidos à análise de variância e, como não foram obtidos bons ajustes para as regressões, os dados foram discutidos somente com base na análise descritiva.

2.2. Estabelecimento de gemas de *Celtis* sp tratadas com Benlate

Explantes foram coletados de ramos pré-tratados com citocinina e benlate (Benlate 500, equivalente a 500gkg-1 de Benomil), três dias antes da coleta. Este pré-tratamento consistiu na imersão das brotações em solução 0,1% de BAP e benlate 200 mgL^{-1}.

Gemas laterais foram coletadas e desinfestadas por 5 minutos em álcool 70% e, posteriormente, imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20%, com três gotas de detergente comercial, durante 20 minutos. Após a desinfestação, os explantes foram lavados em condições assépticas por três vezes com água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, gemas com aproximadamente 3 mm foram inoculados em meio MS sem regulador de crescimento, acrescido 6 gL^{-1} de ágar, pH ajustado para 6 e autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Posteriormente, foram mantidos em uma sala de crescimento a ± 26ºC sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2.000 lux (36 $mol.m^{-2}.s^{-1}$).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (meio MS sem e com benlate) e 26 repetições por tratamento.

Após 15 dias, avaliaram-se o número de contaminações por fungos e por bactérias e o número de oxidações. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste X^2, a 5% de probabilidade.

2.3. Estabelecimento de gemas apicais e laterais de *Celtis* sp tratadas com diferentes concentrações de Benlate

Gemas apicais e explantes nodais de *Celtis* sp foram coletadas e desinfestadas em álcool 70% por 5 minutos e em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20%, com três gotas de detergente comercial durante 20 minutos. Após a desinfecção, os explantes foram lavados

em condições assépticas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, gemas apicais com aproximadamente 3 mm e explantes nodais com 5 mm foram inoculados em meio MS sem regulador de crescimento acrescido 6 gL^{-1} de ágar, pH ajustado para 6 e autoclavado por 20 minutos a 121ºC e 1 atm. Posteriormente, foram mantidos em sala de crescimento a ± 26 ºC sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2.000 lux (36 $mol.m^{-2}.s^{-1}$).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (meio MS com 100, 200, 300, 400 e 500 mgL^{-1} de benlate 500=500gkg^{-1} Benomil) e 10 repetições por tratamento.

Após 15 dias, avaliou-se o número de gemas apicais e laterais verdes contaminadas por fungos. Os dados foram submetidos ao teste X^2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estabelecimento de explantes nodais de *Celtis* sp sob efeito de lavagem em água

Apenas na lavagem de 45 minutos houve oxidação dos explantes, indicando que a lavagem do material em água não diminui a oxidação para esta espécie, que não apresentou problemas de oxidação (Tabela 1). Apesar de se recomendar a lavagem dos explantes, principalmente em espécies lenhosas (Grattapaglia & Machado, 1998), em algumas espécies não há influência do tempo de lavagem quanto à oxidação (Deschamps & Pinto, 1993). Estes resultados parecem indicar que quando a espécie apresenta facilidade para sofrer oxidação, liberando fenóis que provocam oxidação e morte dos explantes, independentemente do tempo de lavagem, a oxidação ocorrerá. Tendo em vista que explantes de *Celtis* sp sem lavagem em água não sofreram oxidação, pode-se concluir que esta espécie não apresenta tendência à oxidação, provavelmente devido à concentração de fenóis não ter sido suficiente para promover a oxidação dos explantes.

Houve diferença significativa entre os tratamentos. Apesar do tempo de lavagem ter efeito significativo sobre a oxidação, não foram obtidos bons ajustes quanto às equações de regressão. Em função disso, foi feita a análise descritiva dos resultados obtidos.

A contaminação por bactérias foi generalizada em todos os tratamentos, variando de 55% a 100 %, indicando que a desinfecção dos explantes com hipoclorito por 15 minutos não foi suficiente e que não houve influência das lavagens em água. A contaminação com fungos aumentou com a lavagem em água, já que no tratamento sem lavagem a mesma não foi observada.

Apesar de ser um resultado contraditório, a lavagem em água favoreceu a distribuição de fungos, que estariam impregnados em locais onde o hipoclorito não atingiu. Além disso, a lavagem em água favoreceu a disseminação dos

Tabela 1. Percentagem de oxidação e contaminação por bactérias e por fungos, em função dos tempos de lavagem dos explantes de *Celtis* sp em água. Areia, PB, 2001.
Table 1. *Percent oxidation and bacteria and fungi contamination in the time of the in water of Celtis sp explants. Areia, PB, 2001.*

T (minutos)	Oxidações (%)	Bactérias (%)	Fungos (%)
0	0	77	0
15	0	66	33
30	0	77	55
45	44	100	33

60	0	55	55

fungos, aumentando a contaminação. Os fungos contaminantes dos explantes foram identificados como sendo *Alternaria* sp e *Curvularia* sp.

3.2. Estabelecimento de gemas de *Celtis* sp tratadas com Benlate

Pela análise de variância, pode-se constatar que houve diferença significativa entre os tratamentos com Benlate para as características percentagem de contaminação por bactérias, por fungos e explantes não oxidados.

O meio com Benlate apresentou maior contaminação por bactérias em relação ao meio sem Benlate (Tabela 2). Uma provável explicação é que, apesar do Benlate controlar a contaminação por fungos, a presença destes junto às bactérias aumentaria a competição por alimento e espaço, diminuindo sua população. Assim, com o Benlate diminuindo a população dos fungos, a população de bactérias aumentaria. Alem disso, este resultado pode estar mascarado pela intensa contaminação por fungos registrada no tratamento sem Benlate, pois não levou-se em consideração a contaminação de bactérias juntamente com os fungos e estes não permitem a visualização das bactérias.

Pode-se observar que o tratamento com Benlate inibiu totalmente o desenvolvimento dos fungos (Tabela 2). Além de inibir o crescimento dos fungos, o Benlate não apresentou fitotoxidez, pois as gemas do tratamento com Benlate que não se contaminaram com bactéria também não se oxidaram. O efeito antioxidante que teve o Benlate pode ter se dado em função da sua formulação química 2-benzimidazolecarbamato ter ação de citocinina (Skene, 1972) e, segundo alguns autores, as citocininas são capazes de atuar como agente redutor em reações fotoquímicas (Rothwell & Wright, 1967).

Tabela 2. Percentagem de contaminação por bactérias (CB) e fungos (CF) e explantes não oxidados (NO), em meio de cultura com e sem Benlate. Areia, PB, 2001.

Table 2*. Contamination percent for bacteria (CB) and fungi (CB) and not oxidation explants (NO) in with and without benlate culture media. Areia, PB, 2001.*

Tratamentos	CB	CF	NO
Com Benlate	27	0	70
Sem Benlate	12	50	38

Hauptman et al. (1985), utilizando 50mgL^{-1} de Benomil (princípio ativo do Benlate) no meio de cultura, controlaram a contaminação por *Penicilium* em culturas de protoplastos de diversas espécies e, em concentrações de 1 a 2 gL^{-1} de Benlate, foi eliminada a contaminação fúngica de ápices de *Camellia* provenientes do campo (Haldemann et al., 1987). Na desinfestação de explantes lenhosos de jabuticabeira e goiabeira, Caldas & Taketomi (1993) utilizaram concentrações de 10 a 100mgL^{-1} de Benlate. Segundo esses autores, todas as concentrações foram eficazes na redução da contaminação. No estabelecimento de segmentos nodais de cajueiro, Silva Neto et al. (1993) utilizaram, no meio de cultura, 50 mgL^{-1} de Benlate. Essa concentração já faz parte do protocolo desenvolvido pelos autores.

Estes trabalhos têm indicado uma grande amplitude nas concentrações de Benlate utilizadas, mostrando, ainda, como foi observado no presente estudo, baixa toxicidade do fungicida para a maioria das plantas. Dessa maneira, pode-se concluir que o uso do Benlate ou benomil na fase de estabelecimento de gemas advindas do campo é fundamental para o sucesso da micropropagação dessa espécie.

3.3. Estabelecimento de gemas apicais e laterais de *Celtis* sp tratadas com diferentes concentrações de Benlate

Apesar dos resultados não terem sido significativos pelo teste X^2, o número de gemas apicais e laterais contaminadas foi pequeno. Já o número de explantes apicais e laterais verdes contaminados foi maior, apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1).

Estes resultados indicam que o Benlate foi eficiente no controle dos fungos nas concentrações utilizadas e não apresentou efeitos fitotóxicos para os explantes nas concentrações testadas. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Wittenbach & Bukovac (1980) que, utilizando, 100mgL^{-1} de Benomil reduziram a contaminação sem afetar o crescimento de explantes de cerejeira.

Figura 1. Número de gemas apicais verdes (GAV), gemas laterais verdes (GLV), gemas apicais contaminadas (GAC) e gemas laterais contaminadas (GLC), em função de diferentes concentrações de Benlate 500 (mgL^{-1}). Areia, PB, 2001.

Figure 1*. Green apical buds number (GAV), green lateral buds (GLV), apical buds contamineted (CGA) and buds lateral contamineted (CGL) in different benlate 500 (mgL^{-1}) concentrations. Areia, PB, 2001.*

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

O *Celtis* sp não apresenta facilidade à oxidação.

A lavagem em água favorece a disseminação de fungos.

O Benlate na concentração de 200mgL^{-1} inibe o crescimento de fungos sem causar fitotoxicidez aos explantes.

A desinfestação com Benlate diminui a contaminação e não é fitotóxica.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelas bolsas de pesquisa e pelo suporte financeiro e ao CCA/UFPB pelo apoio logístico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI, W.; BOERI, P.; MARINUCCI, L. et al. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. **Investigaciones Agrarias: Sistema de Recursos Forestales,** Madrid, v. 9, n. 1, 2000.

ANDRADE, L .A. **Classificação ecológica do território brasileiro situado a leste do meridiano de 44^0 oeste e ao norte do paralelo de 16^0 sul:** uma abordagem climática. 1998. 147 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CALDAS, L. S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jabuticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 107, jun. 1993.

CORRÊA FILHO, J. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura – IBDF, 1984. v. 2, 324 p.

DESCHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. Controle de oxidação e contaminação para o estabelecimento "in vitro"de brotações de sarandi (*Sebastiana schottiana* Muell. Arg. Var. Schottiana) In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO NA ESAL, 4., 1993, Lavras. **Anais...** Lavras: ESAL, 1993. p.179.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and diretory of commercial laboratories.** Everley: Exegetics, 1984. 709 p.

GEORGE, E. F. Equipment and Procedures. In: GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture -** part 1: the technology. 2. ed. 1993. p.116-117

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

GUERRA, M. P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. 1989. 202 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

HALDEMAN, J. H.; THOMAS, R. L.; McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 2, p. 306-307, Apr. 1987.

HAUPTMANN, R. M.; WIDHOLM, J.M.; PAXTON, J. D. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, n. 3, p. 129-132, 1985.

KANASHIRO, M. Genética e melhoramento de essências florestais nativas: aspectos conceituais e práticos. Conservação e utilização Genética dos Recursos Naturais. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, n. 4, p.1167-1178, mar. 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-4997, 1962.

PICININI, E. E. Fungicidas benzimidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 357-409, 1994.

ROTHWELL, K.; WRIGHT, S. T. C. Phytokin activity in some new 6-substituted purines. **Proceedings of the Royal Society of London Serie B biological Science**, London, v. 167, n. 1007, p. 202-223, 1967.

SILVA NETO, S. P.; MARUTA, I.; TAKAIWA, F. et al. Indução de calos em tecido de cajueiro (*Anacardium occidentale*). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 109, jun. 1993.

SKENE, K. G. M. Cytokinins like properties of the systemic fungicide benomyl. **Journal of Horticultural Science & Biotecnology,** Oxford, v. 47, n. 2, p. 179-182, 1972.

WITTENBACH, V. A.; BUKOVAC, M. J. *In vitro* culture of sourcherry fruits. **Journal of American Societ of Horticulture Science**, Alexandria, v. 105, n. 2, p. 277-279, Mar. 1980.

YANG, H. J. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in culture media. **HortScience**, Alexandria, v. 11, n. 5, p. 473-474, Oct. 1976.