

Adição de fungicidas ao meio de cultura na introdução *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild

Adding fungicides to the culture medium in the *in vitro* introduction of *Acacia mearnsii* de Wild

Karina Vanelli KOGUTA [1](#); Vanessa ISHIBASHI [2](#); Giovana Bomfim de ALCANTARA [3](#); Antonio Rioyei HIGA [4](#)

Recebido: 14/08/2017 • Aprovado: 12/09/2017

Conteúdo

- [1. Introdução](#)
 - [2. Material e métodos](#)
 - [3. Resultados e discussão](#)
 - [4. Conclusões](#)
- [Referências bibliográficas](#)

RESUMO:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fungicidas (Cercobin® Kasumin® e Dithane®) no meio de cultura para controlar a contaminação de *Acacia mearnsii*. O delineamento foi em blocos casualizados, com quatro repetições e cinco plantas por parcela. A adição de fungicida ao meio de cultura é uma alternativa viável para o estabelecimento *in vitro* de explantes. O tratamento com Dithane® proporcionou o menor índice de contaminação (7,5%) aos 21 dias. **Palavras-Chave:** Acácia negra, micropropagação, descontaminação

ABSTRACT:

The objective of this study was to evaluate the effects of fungicides (Cercobin® Kasumin® and Dithane®) in culture medium to control contamination of *Acacia mearnsii*. A randomized complete block design with four replicates and five plants per plot was adopted. The addition of fungicides in culture medium is a viable alternative for establishment *in vitro* of explants. The use of Dithane® showed lowest contamination levels (7.5%) at 21 days. **Keywords:** black wattle, micropropagation, disinfection.

1. Introdução

Acacia mearnsii De Wild., popularmente conhecida como acácia negra é originada do Sudeste da Austrália e teve seus primeiros plantios comerciais realizados no Brasil, a partir de 1928 (Oliveira, 1968, 121 p.). Estima-se que a área plantada atual com espécies do gênero *Acacia* seja superior a 148.000 ha (ABRAF, 2013). Acácia negra é utilizada principalmente para produção de madeira (energia, carvão, celulose, painéis de madeira etc.) e casca (tanino,

adesivos, floculantes etc.).

Como fixadora de nitrogênio, a espécie pode ser utilizada na recuperação de solos de baixa fertilidade e recuperação ambiental (ABRAF, 2013). Dentre sua importância ecológica, a acácia negra é uma ótima espécie na recuperação ambiental, pois é uma pioneira de vida curta, que cobre rapidamente o solo, não apresenta rebrota de cepa, não inibe a sucessão local e enriquece o solo pela elevada deposição de folhedo rico em nitrogênio (Grigoletti et al., 2003).

A micropropagação apresenta-se como uma técnica importante em parceria com o melhoramento genético florestal. A alta taxa de multiplicação de plantas micropropagadas acelera os programas de propagação clonal e possibilita a clonagem de indivíduos de alto valor e de difícil enraizamento por meio de outras técnicas, como a estaquia (Brondani et al., 2009) e fornece um material livre de patógenos (Sartoretto, Saldanha, Corder, 2008). Para espécies em que a propagação por estaquia encontra dificuldades e a polinização controlada resulta em um número insuficiente de sementes para suprir as demandas de um plantio comercial, como é o caso da acácia negra, a clonagem utilizando a micropropagação é de extrema importância.

Grande parte dos trabalhos de micropropagação com *Acacia mearnsii* ainda se restringem a partir da germinação *in vitro*, e não de outras fontes de explantes, como segmentos nodais ou meristemas oriundos de material *ex vitro*, dificultando assim o resgate de genótipos superiores. Um dos fatores mais críticos da micropropagação é a fase de desinfestação dos explantes para o estabelecimento da cultura asséptica *in vitro* (Brondani et al., 2009). Para o sucesso na micropropagação a principal dificuldade a ser superada para o sucesso do seu estabelecimento *in vitro* é o fato da espécie apresentar certa recalcitrância ao ser introduzida, não desenvolvendo brotações e raízes.

Uma das principais utilizações da micropropagação de árvores é a possibilidade de rejuvenescimento de material adulto, além de permitir a multiplicação de genótipos superiores. A micropropagação depende de fatores como o genótipo da planta mãe, das concentrações de reguladores vegetais, do tamanho dos explantes, da composição do meio de cultura e das condições ambientais do cultivo e crescimento (George, 2008, 501 p.).

O meio de cultura mais comumente utilizado para micropropagação de plantas é o MS de Murashige e Skoog (1962). Beck e Dunlop (2001) e Disarz e Martins (2009) obtiveram o melhor resultado para acácia negra utilizando o meio MS^{3/4} com dição de 1 g L⁻¹ de carvão ativado. Resultados positivos para o estabelecimento *in vitro* de acácia negra foram obtidos utilizando solução contendo o fungicida Benlate® e/ou cloreto de mercúrio (Beck, Dunlop, Van Staden, 1998). Porém, o uso de Benlate® não é mais permitido no Brasil e o cloreto de mercúrio resulta em grande porcentagem de necrose dos explantes devido a sua alta toxicidade (Scherwinski-Pereira, 2010; Grattapaglia, Machado, 1998). Devido a isso, atualmente grande parte dos trabalhos de micropropagação com acácia negra, utilizam material oriundo de germinação *in vitro* (Disarz, Martins-Corder, 2009; Huang, Al-Khayri, Gbur, 1994) e não de outras fontes de explantes, como segmentos nodais ou meristemas a partir de material genético cultivado em viveiro ou de indivíduos adultos em plantios. Porém esse fungicida não tem sido mais recomendado no Brasil, surgindo a necessidade da pesquisa com outros fungicidas para a desinfestação da espécie para introdução *in vitro*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da adição de diferentes fungicidas (Cercobin® Kasumin® e Dithane®) ao meio de cultura como forma de evitar a contaminação.

2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos com matrizes selecionadas oriundas do minijardim clonal. A fertirrigação do minijardim foi realizada semanalmente com solução nutritiva preparada com produtos comerciais Kristalon® (NPK 18 18 18) (Yara, Brasil) como fonte de macronutrientes e YaraVita Rexolin BRA® (Yara, Brasil) como fonte de micronutrientes. Aproximadamente 48 h antes da coletado material o minijardim clonal recebeu tratamento com fungicida Cercobin® 700 WP (Tiofanato-Metílico) (Iharabras, Brasil) na concentração de 2 g L⁻¹.

Foram utilizados como explantes segmentos nodais oriundos de cepas do minijardim clonal com tamanho aproximado de 2 cm, contendo uma gema axilar. Após a coleta os explantes foram imersos em solução de Cercobin® 0,2% p/v por 20 minutos e então lavados em água corrente por 10 minutos. Em câmara de fluxo efetuou-se a tríplice lavagem em água destilada estéril. Em seguida, os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio de vidro, de 2 cm de diâmetro por 15 cm de altura, com tampa de polietileno, com 10 ml de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o MS (Murashige, Skoog, 1962) com sais reduzidos a $\frac{3}{4}$ com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 0,5% p/v e 30 g L⁻¹ de sacarose. Foi adicionado também ao meio de cultura a solução de desinfestantes de acordo com a tabela 01. O pH foi ajustado a $5,8 \pm 2$, solidificado com 7,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®). A autoclavagem foi realizada a 121°C e com 1,1 Kg/cm² de pressão por 20 minutos. As culturas foram mantidas em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob lâmpadas fluorescentes de 30W, gerando luminosidade média de 2800 lux e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade.

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso (DBC) com seis blocos e oito explantes por parcela. As avaliações foram realizadas aos 7,14 e 21 dias quando avaliou-se a porcentagem de contaminação por fungos e bactérias e a oxidação dos explantes. Para análise estatística foi realizado um teste de normalidade (Shapiro-Wilk), análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,01$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Assistat® versão 7.7, 2017 (Silva, Azevedo, 2016).

Tabela 01 - Tratamento com agentes desinfestantes utilizados na descontaminação superficial de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*.

Desinfestantes	Concentração
Dithane®	2 g L ⁻¹
Cercobin®	1 g L ⁻¹
Cercobin®	2 g L ⁻¹
Kasumin®	2 ml L ⁻¹
Testemunha	

3. Resultados e discussão

Com a avaliação aos 21 dias o melhor tratamento para desinfestação dos explantes de acácia negra com menor contaminação por fungos e bactérias foi o tratamento com Dithane® (2 g L⁻¹) com apenas 7,5% de contaminação, sendo o único tratamento que diferiu estatisticamente do tratamento testemunha, a qual apresentou a maior porcentagem de contaminação (90%), aos 21 dias. Entre os tratamentos com Cercobin® e Kasumin® não houve diferença estatística. Com relação a variável porcentagem de oxidação dos explantes não houve diferença estatística entre os diferentes agentes desinfestantes testados (Tabela 02).

Em um estudo com o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Psidium guajava* L. os tratamentos que incluíram fungicidas no meio de cultura reduziram o aparecimento de fungos no meio de cultivo, o que demonstra que o contato prolongado dos explantes com o fungicida contribuem para o estabelecimento de cultivos assépticos (Ramírez, Salazar, 1997). Entretanto, ainda existem poucos relatos da adição de fungicidas no meio de cultura. A maioria dos trabalhos utilizam os fungicidas antes da inoculação dos explantes em meio de cultivo. Neste sentido, Lafetá et al. (2015), no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, testaram a imersão dos explantes em diferentes concentrações de Cercobin® (0,5, 1, 2 e 4 g L⁻¹) antes da inoculação dos explantes em meio de cultura e obtiveram contaminação fúngica superior a 25%, entretanto a incidência de fungos foi similar para as diferentes concentrações de fungicida em estudo. Visando o desenvolvimento de um protocolo de desinfestação de *Tabebuia rosea*

Bertol DC para propagação *in vitro* foi verificado que enxagues prévios com fungicidas e bactericidas juntamente com a desinfestação superficial dos explantes com hipoclorito de sódio não foi suficiente para eliminar completamente os contaminantes, sendo também observado a expressão tardia de contaminações após vários subcultivos (Suárez, Jarma, Avila, 2006).

Salles (2014) estudando a desinfestação superficial de explantes de acácia, utilizou ácido clorídrico, obtendo contaminação de 70% dos explantes e cloreto de mercúrio (HgCl₂) a 0,4%, com contaminação de 9%, porém com mortalidade 100% das amostras. Isto mostra que a desinfestação de acácia negra representa ainda um fator limitante ao estabelecimento da cultura *in vitro*. A maioria dos trabalhos com acácia negra foram realizados com material proveniente da germinação *in vitro*. No entanto, quando se utiliza material vegetativo proveniente do campo ou casa de vegetação a etapa de inoculação *in vitro* representa uma etapa crucial ao sucesso do estabelecimento e multiplicação. A adição de fungicidas ao meio de cultura pode ser uma alternativa eficiente para o estabelecimento de acácia negra *in vitro*. Quando as plantas matrizes utilizadas como fonte de explantes são provenientes do campo os níveis de contaminação tendem a ser maiores. Porém, mesmo as plantas matrizes submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em casa de vegetação são fontes potenciais de contaminação, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (Medeiros, 1999).

A utilização de Dithane® no meio de cultura é uma alternativa a ser considerada quando se deseja evitar contaminações fúngicas no meio de cultura. Entretanto, estudos complementares devem ser conduzidos visando verificar a existência dos efeitos da regeneração *in vitro* com a aplicação de fungicidas no meio de cultura.

Tabela 02 - Porcentagem de contaminação por fungos e bactérias e oxidação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*, submetidos a diferentes agentes desinfestantes e concentrações, avaliados aos 21 dias.

Tratamentos	Fungos e bactérias (%)	Oxidação (%)
2 g L ⁻¹ de Dithane®	7,50 a	23,00 a
1 g L ⁻¹ de Cercobin®	45,00 b	18,00 a
2 g L ⁻¹ de Cercobin®	50,00 bc	35,00 a
2 ml L ⁻¹ de Kasumin®	60,00 bc	28,20 a
Testemunha	90,00 c	32,00 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que a adição de fungicida ao meio de cultura é uma alternativa viável para a introdução *in vitro* de explantes de *A. mearnsii*. O fungicida Dithane®, na concentração de 2 g L⁻¹, apresenta-se eficaz para evitar a contaminação de segmentos nodais de *A. mearnsii* estabelecidos *in vitro*.

Referências bibliográficas

- ABRAF - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (2013). Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012. Recuperado de <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-abraf13-br.pdf>
- Beck, S., Dunlop, R., Van Staden, J. (december, 1998). Micropropagation of *Acacia mearnsii* from *ex vitro* material. *Plant Growth Regulation*, 26(3), 143-148.
- Beck, S. L., Dunlop, R. W. (September/ October, 2001). Micropropagation of the *Acacia* species - a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(5), 531-538.

- Brondani, G. E., Dutra, L. F., Grossi, F., Wendling, I., Horning, J. (janeiro/fevereiro, 2009). Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Revista Árvore*, 33(1), 11-19.
- Disarz, R., Martins, M. P. C. (2009). Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* De Wild. sob diferentes meios de cultura. *Revista Árvore*, 33(4), 599-606.
- George, E. F., Hall, M. H., De Klerk, G. J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture, volume 1. 3 ed. Dordrecht: Springer.
- Grattapaglia, D., Machado, M. A. (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, v. 1.
- Grigoletti, A., Santos, A. F., Higa, A. R., Mora, A. L., Simon, A. A., Auer, C., Iede, E. T., Curcio, G. R., Rodigheri, H. R., Dedecek, R. A., Higa, R. C. V., Keil, S. S., Penteado, S. do R. C. (2003). Cultivo da acácia-negra. Colombo: Embrapa Florestas. Recuperado de: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AcaciaNegra/CultivodaAcaciNegra>.
- Huang, F. H., Al-Khayri, J. M., Gbur, E. E. (january, 1994). Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 30(1), 70-74.
- Lafetá, B. O., Penido, T. M. A., Sugawara, M. T. Campos, P. M. de (outubro, 2015). Assepsia de explantes caulinares de eucalipto com fungicida sistêmico. *Vozes dos Vales Publicações acadêmicas UFV JM*, 8, 1-15.
- Medeiros, C. P. C. Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.). 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Murashige, T., Skoog, F. A. (july, 1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Oliveira, H. A. (1968) (vol. 2). Acácia-negra e tanino no Rio Grande do Sul. Canoas: La Salle.
- Ramírez, M., Salazar, E. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) (1997). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 14, 497-506.
- Salles, E. A. P. B. Micropropagação de *Acacia mearnsii* De Wild. 2014. 118f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Sartoretto, L. M., Saldanha, C. W., Corder, M. P. M. (maio/junho, 2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, 38(3), 861-871.
- Scherwinski-Pereira, J. E. Contaminações microbianas na cultura de células e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 446p.
- Silva, F. de A. S., Azevedo, C. A. V. de, (september, 2016). The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11(39), 3733-3740.
- Suárez, I. E., Jarma, A. J., Avila, M. (julio/ diciembre, 2006). Desarrollo de un protocolo para propagacion *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Temas Agrarios*, 11(2), 52-62.

-
1. Aluna de graduação do Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR
 2. Mestranda do Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR
 3. Professor do Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR
 4. Professor do Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR
-

