

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ASSÉPTICAS PARA MICROPROPAGAÇÃO DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.)

Bruna Mayara Conti Mondanez (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Adriana Gonela
(Orientadora), Robinson Luiz Contiero (Co-orientador), e-mail:
agonela@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias/Maringá,
PR.

Área e subárea do conhecimento: Agronomia, Fitotecnia

Palavras-chave: Regeneração, explante, desinfestação

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi otimizar um protocolo para desinfestação de segmentos nodais de oliveira. Para tanto, ramos jovens das cultivares Arbequina, Arbosana, Manzanilha e Koroneiki foram coletados em outubro/2019 (experimento 1) e julho/2020 (experimento 2). Os segmentos nodais foram submetidos a seis tratamentos de desinfestação que compreenderam: etanol 70%, hipoclorito de sódio (5% ca – cloro ativo, 6% ca, 7% ca e 12,5% ca) e etanol 70% + 7% ca. Após os tratamentos, os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura OM inicial, sendo mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 32 imol m^{-2} , por três semanas. Após este período, os tratamentos foram avaliados. No experimento 1, não foi possível verificar a eficiência dos tratamentos, pois a câmara de fluxo laminar não estava funcionando adequadamente, o que foi identificado somente na etapa final de montagem do experimento, fato este que contribuiu para que ocorresse 100% de contaminação das amostras, seja por fungos ou bactérias. Por outro lado, no experimento 2, a porcentagem de contaminação variou de 40% na cultivar Arbequina (HS 12,5%) a 100%. Neste caso, o tipo de contaminação observada ocorreu prioritariamente por fungos. Os resultados obtidos no experimento 2 indicaram que o HS pode propiciar uma melhor desinfestação dos segmentos nodais de oliveira, sendo necessário que se continue aprimorando os protocolos de desinfestação para que se consiga uma regeneração adequada de mudas de oliveira.

Introdução

A micropropagação é uma técnica utilizada para obtenção de mudas com alta qualidade sanitária e em larga escala, em um tempo muito mais

rápido do que as técnicas tradicionais (LAMBARDI; RUGINI, 2003). Entretanto, para que se tenha sucesso, é necessário que todas as etapas envolvidas no processo sejam padronizadas. A primeira etapa, e uma das mais importantes, é a desinfestação do explante, pois se não for feita adequadamente, a regeneração das plantas será comprometida. Em se tratando de oliveira (*Olea europaea* L.), a desinfestação é muito difícil em decorrência de microrganismos endógenos, patogênicos ou não, que são difíceis de eliminar, além do genótipo, tipo e idade do explante e época de coleta (LAMBARDI; RUGINI, 2003). Portanto, visando obter um protocolo e adquirir novas informações que possam contribuir para o desenvolvimento de um protocolo adequado para uma rápida e eficiente micropropagação, este trabalho teve como objetivo otimizar um protocolo para a realização da desinfestação de explantes de oliveira.

Materiais e métodos

Experimento 1

Segmentos nodais (SN – aproximadamente 2 cm) foram retirados de ramos jovens das cultivares de oliveira Arbequina, Arbosana, Manzanilha e Koroneiki, coletados em outubro/2019 em uma propriedade localizada no município de Maringá - PR. Os SN ficaram por 12 h em água corrente, depois foram lavados com água destilada e detergente sob agitação (20 min), em seguida tratados com fungicida pirazol 2% (30 min), sendo submetidos aos tratamentos de desinfestação: (a) etanol 70%, com tempos de exposição de 1, 3 e 5 min; (b) hipoclorito de sódio (5% ca – cloro ativo, 6% ca e 7% ca), por 5, 10 e 15 min de exposição em cada concentração, e etanol 70% + 7% ca, por 1+15 min. Esses tratamentos foram conduzidos com e sem a adição de duas gotas de tween 20, perfazendo um total de 26 tratamentos/cultivar com três repetições compostas por nove SN cada. Após a desinfestação, os SN foram inoculados em meio nutritivo OM inicial (RUGINI, 1984), e armazenados em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 32 imol m^{-2} , por três semanas. Posteriormente, os tratamentos foram analisados.

Experimento 2

Em decorrência da pandemia, o experimento foi reestruturado diminuindo-se o número de tratamentos e cultivares. O material vegetal utilizado nessa fase foi composto por SN obtidos das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki localizadas na mesma propriedade do experimento 1. Os procedimentos iniciais foram os mesmos descritos no experimento 1, havendo alteração somente nos tratamentos de desinfestação, quais sejam: (a) etanol 70%, tempo de exposição de 1 min e (b) hipoclorito de sódio, 12,5% ca, por 15 min. Cada tratamento foi composto por 10 repetições com um SN cada, sendo adicionadas duas gotas de tween 20 em todos os tratamentos. Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em meio nutritivo OM inicial, ao qual foi adicionado pentabiótico (Zoetis, 6.000.000

UI), sendo, posteriormente, alocados em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente.

Resultados e Discussão

No experimento 1 foi observada uma elevada incidência de contaminação (100%) em todos os tratamentos/cultivares, tanto por fungos quanto por bactérias (Figura 1). Essa elevada porcentagem de contaminação foi ocasionada principalmente em decorrência de problemas apresentados pela câmara de fluxo laminar, detectados somente nas etapas finais do experimento. Portanto, não foi possível verificar se os tratamentos de desinfestação foram eficientes.

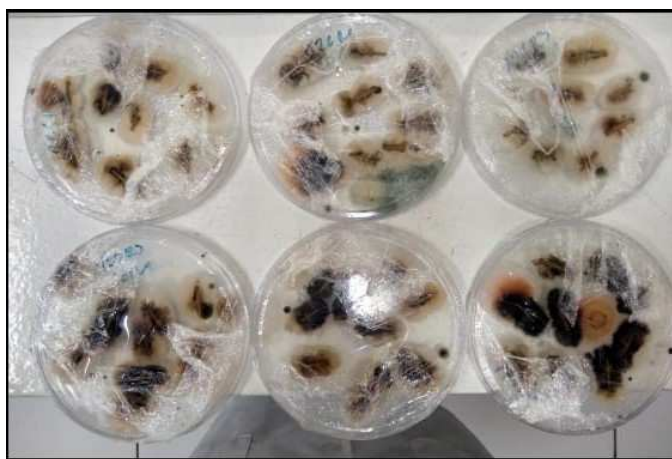


Figura 1 – Resposta dos segmentos nodais de oliveira aos tratamentos de desinfestação realizados no experimento 1, com 100% de contaminação, ocasionados principalmente pelo mau funcionamento da câmara de fluxo laminar.

No experimento 2, não houve problemas com a câmara de fluxo laminar. Portanto, foi possível observar que a porcentagem de contaminação variou de 40% na cultivar Arbequina (H.S. 12,5% ca) a 100% (Tabela 1). O tratamento com hipoclorito de sódio demonstrou ser o mais promissor na desinfestação dos SN, proporcionando as menores porcentagens de contaminação (40% e 70%). Outra observação realizada foi que a cultivar Arbequina foi mais responsiva aos tratamentos. Na literatura há vários protocolos de desinfestação que utilizam tratamentos com hipoclorito de sódio ou cálcio em diferentes concentrações, sozinhos ou combinados com cloreto de mercúrio (HgCl_2) (RUGINI, 1991; MENCUCCINI, 1995; MARTINO *et al.*, 1999; AFRIDI *et al.*, 2015). Os autores destacam que a eficiência desses tratamentos depende muito da cultivar a ser analisada, fato este observado no presente trabalho. Neste contexto, serão realizados novos ensaios testando diferentes tempos de exposição ao HS, diferentes concentrações de fungicidas e um tratamento conjunto de HS + etanol 70%. Concomitantemente, serão avaliadas a viabilidade dos SN que não foram contaminados, pois o processo de desinfestação pode inviabilizar a regeneração dos explantes.

Tabela 1 - Porcentagem de contaminação observada após desinfestação com etanol 70% e hipoclorito de sódio (H.S.) 12,5% ca

Cultivar	Tratamentos	
	Etanol 70%	H.S. 12,5% ca
Arbequina	90%	40%
Arbosana	100%	70%
Koroneiki	100%	100%

Conclusões

Conforme os resultados obtidos, conclui-se que o hipoclorito de sódio tem grande potencial para compor um tratamento eficiente de desinfestação de segmentos nodais de oliveira.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá pela cessão da bolsa de iniciação científica. Ao Sr. César Eduardo Ivantes pela disposição da propriedade para a coleta dos SN. Ao prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto por ter permitido a utilização da sala de crescimento do seu laboratório. À profa. Dra. Maria Celeste Gonçalves Vidigal por ter permitido a utilização da câmara de fluxo laminar do seu laboratório.

Referências

AFRIDI, M.I.; ALI, N.; SHINWARI, K.I.; HASSAN, M.A.; BUTT, A.A.; SHAH, A.; SALMAN, S.; MUHAMMAD, A. Optimization of aseptic conditions for micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cultivar Uslu. **Journal of Bio-Molecular Sciences**, v. 3, n. 1, p. 35-43, 2015.

LAMBARDI, M.; RUGINI, E. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht:Kluwer, 2003. p. 621-646.

MARTINO, L.; CUOZZO, L.; BRUNORI, A. Establishment of meristema tip culture from field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Moraiolo. **Agricoltura Mediterranea**, v. 129, p. 193-198, 1999.

MENCUCCINI, M. Micropropagazione e miglioramento genético *in vitro* dell'olivo: stato dell'arte e prospettive future. **Frutticoltura**, v. 12, p. 73-82, 1995.

RUGINI, E. Stato dell'arte della coltura *in vitro* dell'olivo e prospettive per il miglioramento genético. In: SANSAVINI, S. **Bioteχνologie e resistenze genetiche nelle piante da frutto**. Cesena:Agrobiofrut, 1991. p. 132-147.