



ESTABELECIMENTO IN VITRO DE ESPÉCIES DE AMORA SILVESTRE E FRAMBOESA PRETA

A cultura de tecidos *in vitro* e a micropropagação são técnicas essenciais para a conservação e multiplicação de plantas, mas a contaminação microbiana e a necrose dos explantes dificultam o seu sucesso. Este estudo avaliou diferentes protocolos de esterilização aplicados no estabelecimento *in vitro* de três espécies de *Rubus*, com o objetivo de selecionar o mais eficaz para garantir explantes limpos e viáveis.

Manuel F. Roque^{1,2,3,4}, Silvia Sabbadini¹, Teresa Valdivieso², Mariana Mota⁴, Pedro B. Oliveira^{3,4}, Bruno Mezzetti¹

¹ Departamento de Ciências Agrárias, Alimentares e Ambientais, Università Politecnica delle Marche



² Madre Fruta



³ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



⁴ Laboratório associado TERRA, Centro de investigação LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food



A importância dos *Rubus* spp. silvestres e sua introdução em programas de melhoramento genético

O género *Rubus*, que inclui as amoras, as framboesas, os híbridos e seus ancestrais silvestres, representa um grupo de elevado valor dentro da família Rosaceae, tanto do ponto de vista económico, ecológico e medicinal, como do ponto de vista científico pela sua elevada heterozigosidade. A diversidade de espécies deste género, mais de 750, oferece um potencial significativo para programas de melhoramento genético orientados para o aumento da produtividade, melhoria da qualidade dos frutos, resistência a doenças e adaptação às alterações climáticas (Clark *et al.*, 2007; Graham & Jennings, 2009; Clark & Finn, 2011). As espécies silvestres de *Rubus* constituem também reservatórios genéticos essenciais, contendo características de interesse que podem ser introduzidas em cultivares comerciais já existentes, para melhorar a sua resiliência e capacidade de adaptação (Dossett *et al.*, 2012; Debnath *et al.*, 2022).

Cultura de tecidos e micropropagação – O que são?

A cultura de tecidos vegetais permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos ou órgãos em meio de cultura sob condições assépticas, geralmente contendo nutrientes, reguladores de crescimento e uma fonte de carbono (George *et al.*, 2008). A micropropagação, uma das suas aplicações mais amplamente utilizadas, consiste na multiplicação clonal de plantas a partir de pequenos fragmentos vegetais, como gomos ou segmentos nodais, permitindo a produção rápida e em larga escala de indivíduos geneticamente idênticos (Thorpe, 2007; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). Esta técnica é amplamente utilizada na conservação de germoplasma, em melhoramento genético e na produção de clones de cultivares de interesse para fins comerciais (Debnath, 2014; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018; Debnath & Ghosh, 2022).

Desafios na micropropagação (contaminação, perda de explantes por necrose e oxidação)

A micropropagação *in vitro* tornou-se uma ferramenta fundamental para a multiplicação rápida, conservação e melhoramento genético de espécies de *Rubus* (Dziedzic e Jagła, 2013; Debnath, 2014; Clapa *et al.*, 2021). No entanto, um dos principais obstáculos ao seu sucesso é a contaminação microbiana por bactérias e fungos, o que pode levar à perda de material vegetal e diminuição da eficiência dos protocolos de estabelecimento *in vitro* e micropropagação (Leifert *et al.*, 1989; Cassells, 2001). Estes desafios são agravados por respostas específicas de cada genótipo, o que exige o desenvolvimento de protocolos de esterilização adaptados a cada caso (Thomas e Prakash, 2004; Anđelić *et al.*, 2023).

Importância do desenvolvimento de protocolos de esterilização eficazes

Um método de esterilização eficaz deve garantir a eliminação de microrganismos contaminantes sem comprometer a viabilidade dos explantes. Este processo requer um equilíbrio entre a eficácia antimicrobiana e a fitotoxicidade, sendo que a aplicação excessiva de agentes químicos pode induzir necrose e oxidação basal, comprometendo o crescimento e a sobrevivência dos explantes em cultura (George *et al.*, 2008; Teixeira da Silva *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstraram diferentes níveis de eficácia dos agentes de esterilização, como o hipoclorito de sódio, o etanol e misturas conservantes como o PPM™ (*Plant Preservative Mixture*), entre outros, sendo muitas vezes necessário o ajuste das concentrações destes agentes para diferentes genótipos (Cassells e Doyle, 2005; Niedz e Bausher, 2002).

Objetivo do estudo

Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar protocolos de esterilização eficazes para diferentes espécies silvestres de *Rubus* pertencentes à coleção do INIAV, nomeadamente, *R. ulmifolius* ecótipo Arripiado (RuA), *R. occidentalis* (Roc) e *R. hochstetterorum* (Rho) – com vista ao estabeleci-

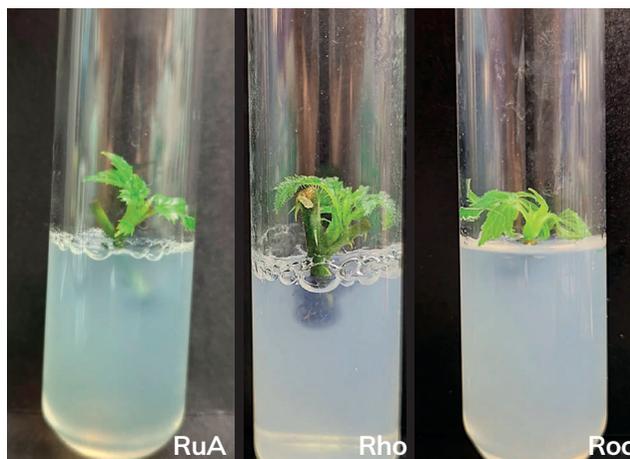


Figura 1 – Explantes nodais dos genótipos silvestres de *Rubus* estabelecidos *in vitro* com sucesso, após aplicação dos protocolos de esterilização testados. Da esquerda para a direita: *R. ulmifolius* ecótipo Arripiado (RuA), *R. hochstetterorum* (Rho) e *R. occidentalis* (Roc). As plantas apresentam novos crescimentos e folhas expandidas, indicadores de viabilidade e ausência de contaminação visível.

mento *in vitro* isento de contaminações (Figura 1). Pretendeu-se selecionar os tratamentos mais adequados para cada espécie, garantindo uma descontaminação eficiente dos explantes nodais. Paralelamente, procurou-se assegurar a ausência de efeitos fisiológicos adversos, como a necrose e a oxidação basal, de forma a maximizar a viabilidade e o desenvolvimento inicial das plantas em cultura. Estes esforços visam apoiar estratégias de conservação de germoplasma e aplicações em programas de melhoramento genético, tanto para espécies silvestres como para seleções de genótipos provenientes de programas de melhoramento, nomeadamente, para o nosso grupo de trabalho, no âmbito do programa de melhoramento iniciado em 2021 através de uma parceria público-privada entre o INIAV e a Madre Fruta. Os resultados apresentados inserem-se no projeto de doutoramento já divulgado na revista *Vida Rural 1888* (Roque *et al.*, 2023), os quais serão determinantes para o sucesso da indução de poliploidia e micropropagação de genótipos promissores selecionados no âmbito do programa de melhoramento.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Utilizaram-se 3 espécies silvestres de *Rubus* spp.: *R. ulmifolius* ecótipo Arripiado (RuA), *R. occidentalis* (Roc) e *R. hochstetterorum* (Rho), pertencentes à coleção de *Rubus* spp. silvestres do INIAV. Segmentos caulinares (15 a 20 cm) foram colhidos em julho de 2024, provenientes de novos rebentos dos 3 genótipos identificados, que se encontravam cultivados em vasos de 10 L (3 vasos/genótipo) na estufa de vidro da Università Politecnica Delle Marche (Ancona, Itália), para posterior introdução *in vitro* (Figuras 2.1 a 2.8).

Protocolos de esterilização

O estudo foi dividido em dois ensaios (E1 e E2). No primeiro (E1), testaram-se dois protocolos de esterilização:

- **P1** – Pré-lavagem com água corrente e Tween 20 (15 min) + Etanol 70% (20 s) + água estéril (2 min) + NaClO 10% com Tween 20 (12 min) + 3 lavagens (1, 5 e 10 min) (Figuras 2.7 a 2.8);
- **P2** – Igual ao P1, mas sem a etapa de esterilização com etanol.

Após desinfecção, os explantes foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo vitaminas, 30 g/L de sacarose, 0,5 mg/L de BAP, 7 g/L de agar vegetal (Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Baixos).

Devido à elevada contaminação verificada na espécie Rho, foi realizado um segundo ensaio (E2), no qual se testou um terceiro protocolo (**P3**) com maior tempo de exposição ao etanol (40 s) e a inclusão de 2 mg/L de PPM™ (Plant Cell Technology,

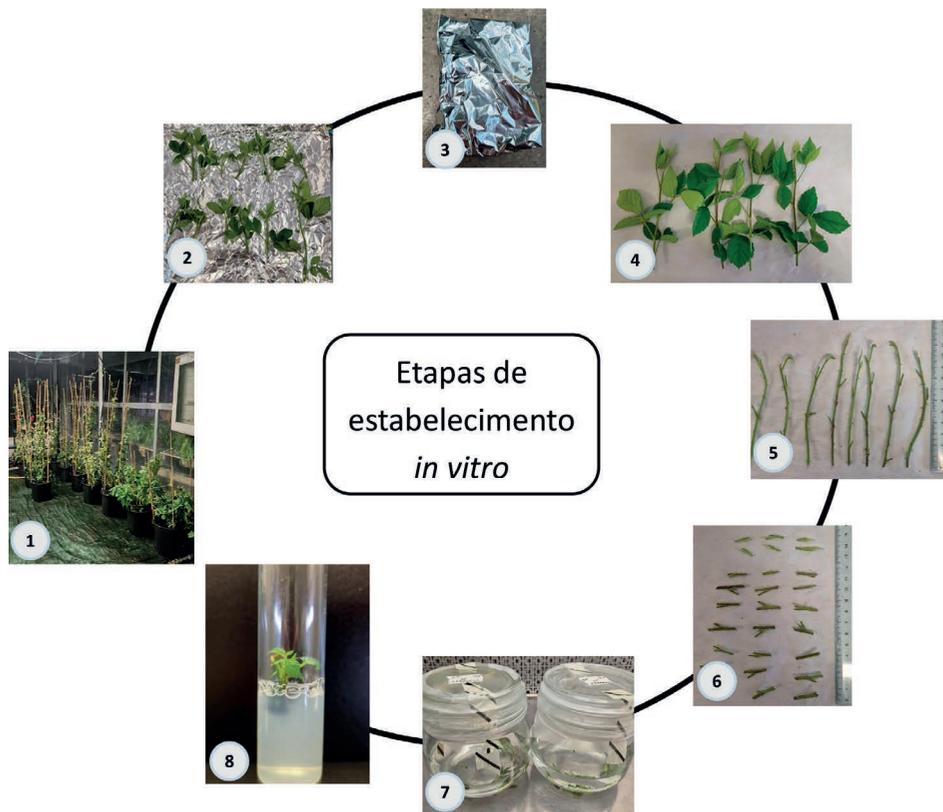


Figura 2 – Diagrama ilustrativo das principais etapas do processo de estabelecimento *in vitro* de explantes de *Rubus* spp. silvestres. (1) Plantas acondicionadas na estufa de vidro da UNIVPM; (2–3) Colheita dos segmentos caulinares e respectivo acondicionamento em folha de alumínio para transporte até ao laboratório de forma a evitar a transpiração excessiva e degradação dos tecidos; (4–6) Preparação preliminar do material vegetal, no laboratório com disposição dos raminhos colhidos, remoção das folhas e corte dos segmentos caulinares fracionando-os em segmentos nodais; (7) Execução dos protocolos de esterilização; (8) Cultura *in vitro* em meio de cultura apropriado para posterior avaliação da sua viabilidade.

EUA) no meio de cultura. As taxas de contaminação e viabilidade dos explantes foram avaliadas ao longo de três semanas.

Resultados

Eficácia dos Protocolos de Esterilização

A eficácia dos protocolos de esterilização variou entre os 3 genótipos em ambos os ensaios. No Ensaio 1, o RuA apresentou os melhores resultados, com 82% e 75% de explantes limpos nos protocolos P1 e P2, respetivamente. Por outro lado, o Rho revelou elevada recalcitrância, com 92-100% de

contaminação e quase nenhuma viabilidade. O Roc teve um desempenho intermédio relativamente aos genótipos RuA e Rho em ambos os protocolos aplicados (56%) (Figura 3).

No Ensaio 2, a introdução do protocolo P3 e do biocida PPM™ resultou em melhorias moderadas no Rho (até 46% de material limpo com P1), embora com o aumento de necrose e possível fitotoxicidade. O genótipo RuA respondeu negativamente ao PPM™, com desempenho decrescente até 33% em P3. Contudo, o Roc beneficiou do protocolo P2 (50%), sugerindo que a não utilização de etanol como agente de esterilização é mais adequado para esta espécie (Figura 4).

Os dados reforçam a necessidade de protocolos de esterilização específicos para diferentes genótipos, com atenção à sensibilidade fisiológica e à possível inclusão de antioxidantes, como o ácido ascórbico, para reduzir a oxidação induzida por tratamentos mais agressivos.

Agentes causais de contaminação e efeitos fisiológicos

No Ensaio 1, os três genótipos em estudo apresentaram, mais uma vez, respostas distintas aos protocolos de esterilização P1 e P2 quanto à frequência de agentes causais de contaminação e aos efeitos fisiológicos que se verificaram (Figuras 5 e 6).

Para o RuA, ambos os protocolos resultaram em 100% de oxidação basal, evidenciando forte stress oxidativo, enquanto os níveis de contaminação por fungos e bactérias foram baixos no P1 e moderados no P2. Para o Rho, observou-se uma elevada contaminação bacteriana, especialmente no P2 (93%), tendo sido também considerável a contaminação provocada por fungos e algum grau de necrose, sem sinais de oxidação basal. Estes resultados indicam recalcitrância deste genótipo, provavelmente associada a infeções endógenas, remetendo à necessidade de adoção de estratégias complementares de descontaminação, como o uso de agentes antimicrobianos específicos e/ou tratamentos combinados. De realçar ainda que este genótipo em particular tem especial suscetibilidade ao ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’, pelo que este facto poderá

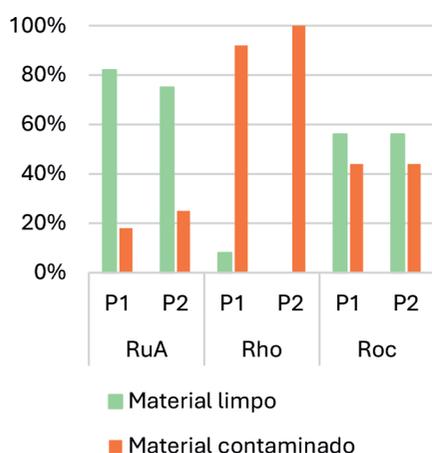


Figura 3 – Proporção de explantes limpos e contaminados dos genótipos RuA, Rho e Roc após aplicação dos protocolos de esterilização P1 e P2 no Ensaio 1.

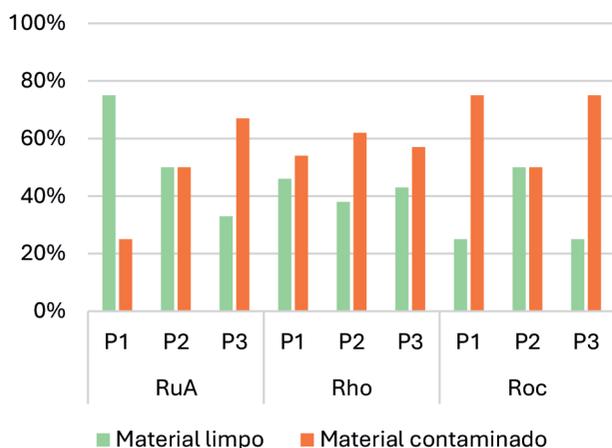


Figura 4 – Proporção de explantes limpos e contaminados dos genótipos RuA, Rho e Roc após aplicação dos protocolos de esterilização P1, P2 e P3 no Ensaio 2.



Figura 5 – Exemplos de sintomas causados por agentes contaminantes e efeitos fisiológicos adversos observados em explantes de *Rubus* spp. silvestres durante o processo de estabelecimento *in vitro*. Da esquerda para a direita: contaminação fúngica (micélio visível), contaminação bacteriana (turbidez e biofilme), necrose dos tecidos (escurecimento progressivo), e oxidação basal (escurecimento da base do explante associado à produção de compostos fenólicos).

estar associado a um maior grau de contaminações verificado. No genótipo Roc, a contaminação fúngica foi predominante com o protocolo P1 (56%) e manteve-se relevante em P2 (33%). A contaminação bacteriana também foi expressiva, mas reduziu-se de 44% (P1) para 11% (P2), o que sugere maior eficácia do segundo protocolo no controlo bacteriano. Contudo, este resultado foi acompanhado por um aumento da necrose (de 11% para 22%) e da oxida-

ção basal (de 33% para 44%), indicando um possível efeito fitotóxico do tratamento mais agressivo.

De forma geral, o protocolo P1 demonstrou melhor desempenho nos genótipos menos recalcitrantes (RuA e, em parte, Roc), com níveis de contaminação aceitáveis e menor impacto fisiológico. Já o protocolo P2 mostrou-se mais eficaz no controlo bacteriano em Roc, mas causou maiores danos fisiológicos, especialmente em Rho, onde o sucesso da descontaminação foi praticamente nulo. A elevada oxidação basal, particularmente em RuA e Roc, destaca a necessidade de ajustes nos protocolos, nomeadamente a adição de compostos antioxidantes no meio de cultura ou no pré-tratamento.

Estes dados reforçam a importância de adaptar os protocolos de esterilização à especificidade fisiológica e microbiológica de cada genótipo, especialmente em materiais vegetais silvestres com elevada variabilidade.

No E2, o genótipo RuA não apresentou qualquer contaminação fúngica nos três protocolos testados. A presença de bactérias foi baixa (entre 10% e 15%), sem grandes variações entre protocolos. No entanto, observou-se um aumento da necrose com os protocolos P2 e P3 (25%), sugerindo um possível efeito fitotóxico do etanol durante a esterilização ou à presença de PPM™ no meio de cultura (Figura 7). A oxidação basal manteve-se elevada e constante (100%) em todos os casos, evidenciando que o aditivo não foi suficiente para mitigar o stress

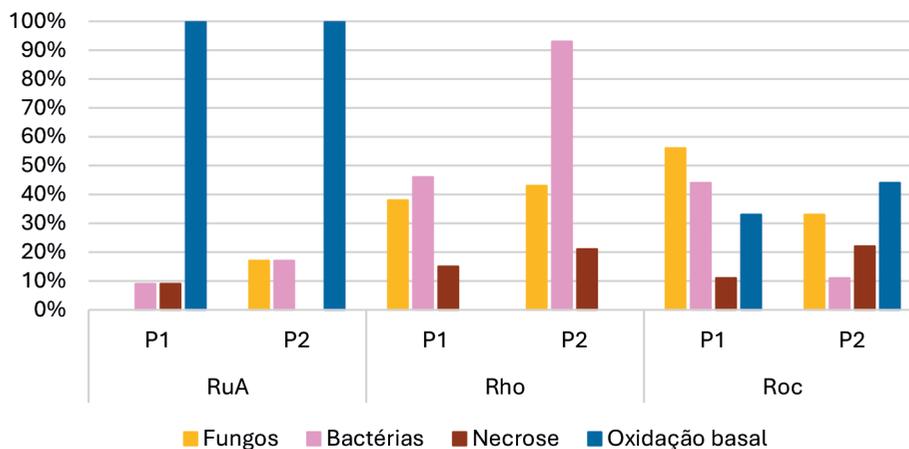


Figura 6 – Frequência de fungos, bactérias, necrose e oxidação basal nos explantes dos genótipos RuA, Rho e Roc após aplicação dos protocolos de esterilização P1 e P2 no Ensaio 1.

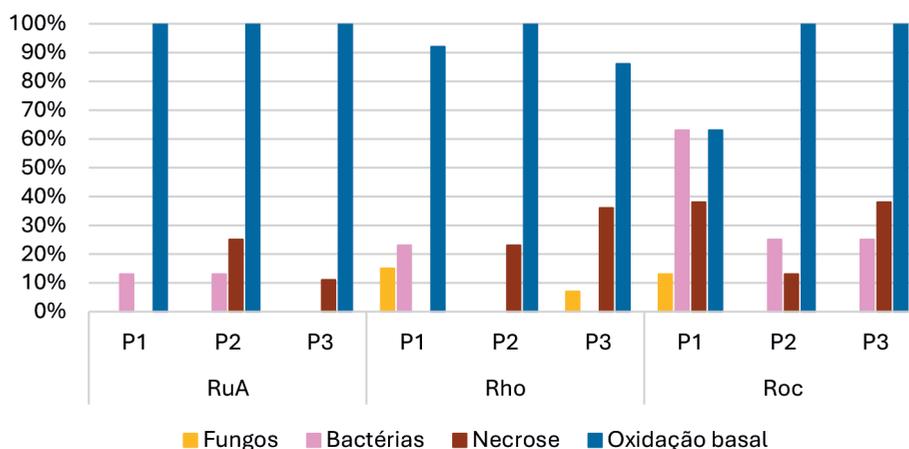


Figura 7 – Frequência de fungos, bactérias, necrose e oxidação basal nos explantes dos genótipos RuA, Rho e Roc após aplicação dos protocolos de esterilização P1, P2 e P3 no Ensaio 2.

oxidativo, possivelmente induzido pela resposta fenólica típica de genótipos silvestres.

No Rho, a adição do protocolo P3 e do PPM™, face ao ensaio 2, teve uma repercussão positiva reduzindo eficazmente a contaminação bacteriana (P1 – 23%; P2 e P3 – 0%). Contudo, a necrose aumentou de 0% em P1 para 23 e 36% em P2 e P3, respectivamente, o que pode indicar alguma sensibilidade dos tecidos ao PPM™ e ao etanol.

No genótipo Roc, os níveis de contaminação fúngica foram controlados nos três protocolos (10 a 13%). A contaminação bacteriana foi mais acentuada no P1 (63%) e moderada em P2 e P3 (25%). A necrose foi mais relevante no P3 (38%), evidenciando, à semelhança dos outros genótipos, uma possível fitotoxicidade associada ao PPM™ e ao uso de etanol na esterilização. A oxidação basal, por sua vez, foi extrema em P2 e P3 (100%) e inferior em P1.

De forma geral, os dados do Ensaio 2 confirmam a influência genótipo-dependente na resposta aos protocolos de esterilização. A aplicação do PPM™ permitiu controlar a contaminação bacteriana, sobretudo no Rho, contudo resultou em efeitos fisiológicos adversos, como o aumento da necrose e a existência de níveis elevados de oxidação basal. Estes resultados sublinham a necessidade de ajustar a concentração do biocida e também do tempo de esterilização em etanol e complementar os protocolos com antioxidantes para garantir a viabilidade dos explantes durante a fase inicial da cultura *in vitro*.

Efeitos dos protocolos de esterilização nos parâmetros de desenvolvimento dos explantes após estabelecimento *in vitro*

No E1, o genótipo RuA destaca-se com uma elevada percentagem de novos crescimentos (91% e 100% para P1 e P2, respetivamente) e bons índices de sobrevivência (~60%) (Figura 8). O número médio de folhas expandidas, uma semana após a esterilização, foi de 2,3, indicando a existência de atividade metabólica após estabelecimento *in vitro*. Por outro lado, o Rho demonstrou fraco desempenho global, especialmente no P2 (apenas 21% de novos crescimentos e sobrevivência de 29%). O Roc evidenciou resultados medianos, com crescimentos e sobrevivência na ordem dos 33–56%, e valores mais elevados de expansão foliar (~3), indicando uma melhor *performance* morfogénica do que os restantes genótipos.

No E2, com a introdução do protocolo P3 e adição de PPM™, observou-se uma melhoria significativa na *performance* geral, particularmente no genótipo Rho, que aumentou em número de novos crescimentos (57–69%) e de sobrevivência (~50%), nos protocolos P1 e P3 (Figura 9). O RuA manteve os níveis de crescimento (100%) para os P1 e P2 à semelhança do E1, contudo uma menor sobrevivência no P3, possivelmente devido à fitotoxicidade do PPM™ e à maior exposição ao etanol durante a etapa de esterilização. No Roc, comparativamente ao E1, os valores registados para novos crescimentos

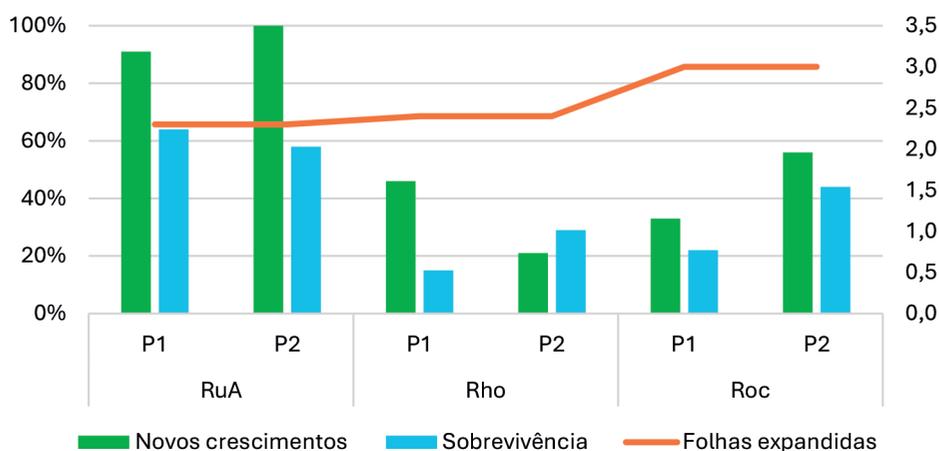


Figura 8 – Parâmetros de desenvolvimento dos explantes dos genótipos RuA, Rho e Roc no Ensaio 1 após aplicação dos protocolos de esterilização P1 e P2.

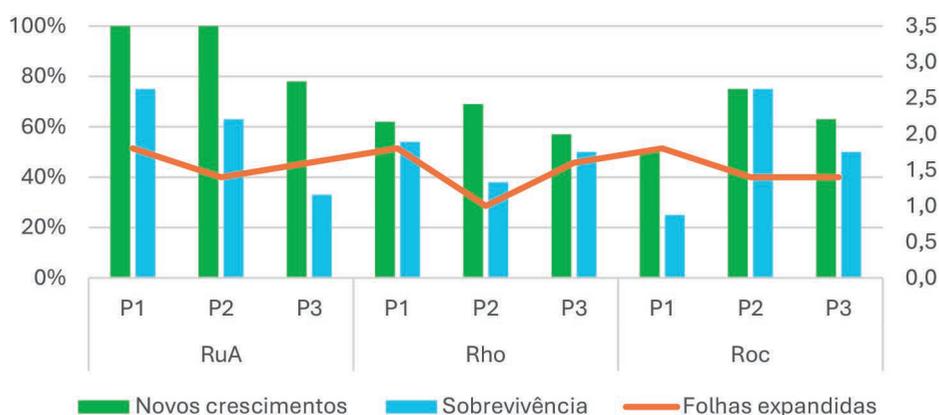


Figura 9 – Parâmetros de desenvolvimento dos explantes dos genótipos RuA, Rho e Roc no Ensaio 2 após aplicação dos protocolos de esterilização P1, P2 e P3.

e sobrevivência foram consideravelmente melhores, com destaque para o P2 com ambos os parâmetros a registar um valor de 75%. Relativamente ao número de folhas expandidas, observou-se em geral valores inferiores aos verificados no E1 para os três genótipos, indicando mais uma vez o efeito repressivo que o PPM™ poderá ter no metabolismo dos explantes. Foi ainda possível verificar que o P1 evidenciou os valores mais elevados para este parâmetro, 1,8 para os três protocolos, o que poderá levar-nos a reforçar a ideia de que o etanol pode ter um efeito negativo no metabolismo dos explantes.

Conclusões

O presente estudo permite concluir que a eficácia dos protocolos de esterilização na introdução *in*

vitro de espécies de *Rubus* silvestres é dependente do genótipo, reforçando a necessidade de delinear protocolos específicos. O protocolo P1, o único que não inclui uma etapa de esterilização com etanol, foi em termos gerais mais eficaz em genótipos menos recalcitrantes (RuA e Roc), promovendo taxas superiores de material limpo e sobrevivência. Em contrapartida, o genótipo Rho, o mais recalcitrante, foi o que se revelou mais resistente à obtenção de explantes descontaminados. Contudo, o E2, com a adição do agente biocida PPM™, permitiu melhorar a eficácia de descontaminação, evidenciando a necessidade de adoção de estratégias mais agressivas para este genótipo. Por outro lado, apesar de útil no controlo bacteriano, o PPM™ associou-se frequentemente a necrose e oxidação basal, sugerindo

fitotoxicidade, e diminuição da taxa metabólica dos explantes. O etanol também poderá ter tido alguma repercussão no aparecimento destes sintomas. A oxidação basal foi elevada em todos os genótipos, indicando a necessidade de integração de antioxidantes, como o ácido cítrico ou ascórbico. O Roc destacou-se dos restantes genótipos pela sua capacidade metabólica, desenvolvendo um maior número de folhas expandidas.

Finalmente, este trabalho permitiu o desenvolvimento de protocolos genótipo-específicos, sendo que estes devem assegurar a descontaminação eficaz dos explantes e a sua viabilidade fisiológica, as quais são essenciais para o sucesso da micropropagação de *Rubus silvestres* em contextos de conservação de germoplasma e melhoramento genético. 🌱

Bibliografia

- Anđelić, B.; Cerović, R.; Gološin, B. (2023). Comparative study of different surface sterilization treatments and optimal month for establishment of aseptic cultures of raspberry cultivars. *Journal of Central European Agriculture*, **24**(1):52–60.
- Cassells, A.C. (2001). Contamination and its impact in tissue culture. *Acta Horticulturae*, **560**:353–360.
- Cassells, A.C.; Doyle, B.M. (2005). Pathogen and biological contamination management: The road ahead. In: V.M. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 35–50). Humana Press.
- Clapa, D.; Monica, H.; Viorel, C. (2021). Micropropagation of raspberries (*Rubus idaeus* L.) in liquid media by temporary immersion bioreactor in comparison with gelled media. *Agronomy*, **11**(11):2266.
- Clark, J.R.; Stafne, E.; Hall, H.; Finn, C.E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, **33**: 19–144.
- Debnath, S.C. (2014). Bioreactor-induced adventitious shoot regeneration affects genotype-dependent morphology but maintains clonal fidelity in red raspberry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, **50**(6): 777–788. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9632-2>.
- Debnath, S.C.; Ghosh, A. (2022). Phenotypic variation and epigenetic insights into tissue culture in berry crops. *Frontiers in Plant Science*, **13**:1042726.
- Dossett, M.; Bassil, N.V.; Lewers, K.S.; Finn, C.E. (2012). Genetic diversity in wild and cultivated black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) evaluated by simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **59**: 1849–1865.
- Dziedzic, E.; Jagła, J. (2013). Micropropagation of *Rubus* and *Ribes* spp.: Protocols for plant breeding and germplasm conservation. *Methods in Molecular Biology*, **11013**:149–160.
- Clark, J.R.; Finn, C.E. (2011). Blackberry Breeding and Genetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, **5**:27–43.
- George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed.). Springer.
- Graham, J.; Jennings, N. (2009). Raspberry Breeding. In: *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Springer, New York, NY.
- Leifert, C.; Waites, W.M.; Nicholas, J.R. (1989). Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, **67**:353–361.
- Loyola-Vargas, V.M.; Ochoa-Alejo, N. (2018). *Plant Cell Culture Protocols* (3rd ed.). Humana Press.
- Niedz, R.P.; Bausher, M.G. (2002). Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, **38**:468–471.
- Roque, M.F.; Valdivieso, T.; Trindade, C.S.; Mota, M.; Oliveira, P.B. (2023). Melhoramento Genético em Amora: Oportunidades e Desafios. *Vida Rural*, **1888**:54–59.
- Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, **37**(2):169–180.