

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DESINFESTAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE MAMÃO HERMAFRODITA CULTIVAR ALIANÇA

Eduardo Santos Cade¹, Tamyris de Mello²

João Pedro Vieira Fraga de Assis², Mariana Ribeiro de Almeida¹, Simone Wellita Simão de Carvalho¹, José Carlos Lopes¹, Rodrigo Sobreira Alexandre²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/nº, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, eduardo.cade@edu.ufes.br, mariribeiro11@hotmail.com, simonewellita@gmail.com, jclufes@gmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Avenida Governador Lindemberg, 316, Centro, 29550-000, Jerônimo Monteiro - ES, Brasil, tamyrisdemello@gmail.com, joaopedrov80@gmail.com, rodrigossobreiraalexandre@gmail.com

Resumo

Este estudo, buscou explorar um protocolo de desinfestação para ápices caulinares do mamoeiro cultivar Aliança, abordando o problema da disseminação de doenças e variabilidade genética resultante da polinização livre. A ausência de protocolos de eficácia da propagação vegetativa levou ao uso da cultura de tecidos vegetais, onde a contaminação microbiana é crítica. Objetivou-se com esse trabalho desenvolver um protocolo de desinfestação de ápices caulinares de mamoeiro do grupo solo cultivar Aliança, testando diferentes concentrações de antibióticos e fungicida. As etapas experimentais foram conduzidas com ápices caulinares coletados da cultivar Aliança, dividido em dois experimentos com cinco e seis tratamentos de desinfestação, utilizando diferentes agentes desinfestantes, e transferidos para meio de cultura, analisando ao final, as porcentagens de contaminações bacterianas e fúngicas. Resultados destacaram a eficácia do cloridrato de ciprofloxacino em comparação a outros tratamentos. O cloridrato de ciprofloxacino a 3 g L⁻¹ por 24 horas foi o agente desinfestante mais eficiente, demonstrando controle tanto de bactérias quanto de fungos.

Palavras-chave: Antibiótico. *Carica papaya*. Cultivo *in vitro*.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônoma – Agronomia

Introdução

A propagação semínifera do mamoeiro resulta em problemas de disseminação de doenças e de variabilidade genética, decorrentes da polinização livre (SCHMILDT et al., 2007). Apesar dos problemas genéticos, principalmente quanto à herança do sexo, este método de propagação é utilizado devido à inexistência de protocolos eficientes de propagação vegetativa (TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2004).

Na cultura de tecidos vegetais, é primordial o controle e a prevenção da contaminação microbiana, pois o meio de cultura proporciona um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos (DANTAS et al., 2002). O desenvolvimento de protocolos, utilizando-se técnicas de cultura de tecidos vegetais como a propagação *in vitro*, proporciona a multiplicação de plantas com características agrônomicas desejáveis, como híbridos e plantas hermafroditas com excelentes padrões de qualidade morfológica, sanitária e fisiológica. Assim, surge uma alternativa promissora, pois esta técnica constitui-se em um recurso útil, na rápida formação de clones com características superiores (SCHIAVINATO et al., 2008).

Os antibióticos vêm sendo usados com frequência cada vez maior na cultura de tecidos vegetais, principalmente em plantas que apresentam dificuldade na fase de descontaminação, sendo tais substâncias incorporadas ao meio de cultura ou usadas diretamente sobre os explantes (POLLOCK et al., 1983; BOBROFF et al., 2009).

Objetivou-se com esse trabalho desenvolver um protocolo de desinfestação de ápices caulinares de mamoeiro do grupo solo cultivar Aliança, testando diferentes concentrações de antibióticos e fungicida.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAIE) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no município de Jerônimo Monteiro.

O material vegetativo (ápices caulinares) foi coletado de matrizes da cultivar Aliança do grupo Solo, mantidas em ambiente protegido no viveiro da UFES, localizado no mesmo município, próximo ao laboratório onde a experimentação foi realizada. As mudas de mamoeiro foram produzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, semeadas em papel germitest e mantidas em uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) e depois foram replantadas na casa de vegetação, em bombonas com substrato (Carolina soil®), e irrigadas manualmente, mantidas sob essa condição até o florescimento. Após o florescimento, as matrizes foram selecionadas deixando apenas as plantas hermafroditas, e dessas plantas foram cortados os ápices para indução de brotações laterais. Após essa indução, as brotações foram coletadas e conduzidas em sacolas plásticas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde foram desinfestadas. Já no laboratório, o material foi lavado em água corrente e detergente neutro. O estudo foi dividido em dois experimentos com cinco e seis tratamentos de desinfestação.

No primeiro experimento, na câmara de fluxo laminar, a desinfestação foi feita com a imersão dos ápices caulinares por um minuto em álcool 70%, 20 min em hipoclorito de sódio (2,5% de NaClO ativo, Candura®), seguido dos diferentes antibióticos (Tabela 1), onde permaneceram por 24 h, em incubadora de agitação orbital (shaker), com temperatura a 27 °C, no escuro.

Tabela 1- Desinfestação com imersão dos ápices caulinares por 24 horas em shaker

Tratamentos	Desinfestação
T1	Rifampicina (600 mg L ⁻¹)
T2	Amoxicilina (3000 mg L ⁻¹)
T3	Cloridrato de ciprofloxacino (3000 mg L ⁻¹)
T4	Kasumin (5 mL L ⁻¹)
T5	Amoxicilina (1 g L ⁻¹) + Cloridrato de ciprofloxacino (1 g L ⁻¹) + Azitromicina (1 g L ⁻¹)

Fonte: Os autores.

No segundo experimento, na câmara de fluxo laminar, a desinfestação foi feita com a imersão dos ápices caulinares por um minuto em álcool 70%, seguido de diferentes agentes desinfestantes e tempos de imersão (Tabela 2), onde permaneceram em shaker, com temperatura a 27 °C, no escuro.

Tabela 2- Desinfestação com imersão dos ápices caulinares por diferentes tempos

Tratamentos	Desinfestação
T1	15 min em dicloroisocianurato de sódio (1%) + 10 h em cloridrato de ciprofloxacino (3 g L ⁻¹)
T2	15 min em dicloroisocianurato de sódio (1%) + 24 h em amoxicilina (3 g L ⁻¹)
T3	15 min em dicloroisocianurato de sódio (1%) + 24 h em rifampicina (600 mg L ⁻¹)
T4	15 min em hipoclorídrico de sódio (2,5%) + 10 h de cloridrato de ciprofloxacino (3 g L ⁻¹) + 15 min em captana (6%)

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

T5	15 min em hipoclorídrico de sódio (2,5%) + 24 h em amoxicilina (3 g L ⁻¹) + 15 min em captana (6 %)
T6	15 min em hipoclorídrico de sódio (2,5%) + 24 h em rifampicina (600 mg L ⁻¹) + 15 min em captana (6%)

Fonte: Os autores.

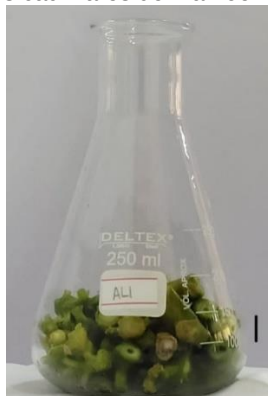
Cada etapa foi seguida por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, o material foi transferido para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®), 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®), com pH ajustado a 5,7 ± 0,1. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 60 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 8/16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C.

Ao final da experimentação, foi contabilizado o número de explantes contaminados por fungos e/ou bactérias e calculado a porcentagem de contaminação, determinando o melhor tratamento a ser utilizado. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de dez tubos cada, totalizando 40 tubos/explante por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2023).

Resultados

Após protocolos de desinfestação, em ambos os experimentos, os ápices caulinares não apresentaram características oxidativas (Figura 1).

Figura 1 – Ápices caulinares de mamoeiro cultivar Aliança.

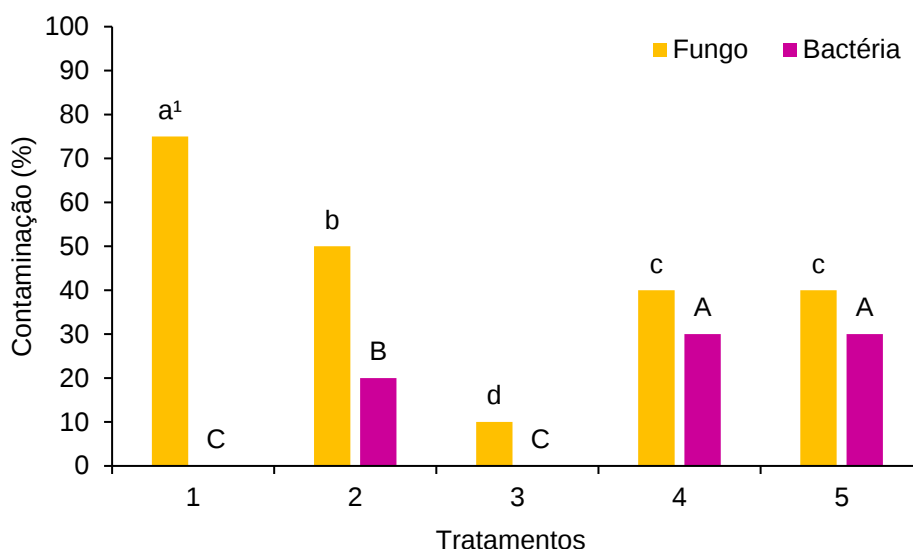


Barra de escala: 1cm. Fonte: Os autores.

Com base nas análises feitas no experimento 1, o primeiro tratamento (rifampicina) apresentou efetividade à taxa de contaminação bacteriana (0%), porém, ineficiência a taxa de contaminação fúngica (75%). Enquanto o terceiro tratamento (cloridrato de ciprofloxacino), apresentou a menor taxa de contaminação bacteriana (0%) e fúngica (10%) mostrando ser a desinfestação mais eficiente com menor taxa de contaminação (Figura 2).

Figura 2. Experimento 1: porcentagem de contaminação nos diferentes tratamentos desinfestantes em ápices caulinares da cultivar Aliança.

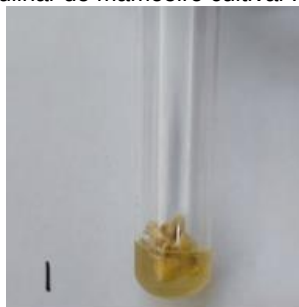
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Sendo: 1. Rifampicina; 2. Amoxicilina; 3. Cloridrato de ciprofloxacino; 4. Kasumin; 5. Amoxicilina + Cloridrato de ciprofloxacino + Azitromicina. ¹Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Os autores.

Com relação ao experimento 2, o terceiro tratamento (dicloroisocianurato de sódio + rifampicina) e o sexto (hipoclorito de sódio + rifampicina) apresentaram efetividade à taxa de contaminação bacteriana (ambos 0%), porém, ineficiência à taxa de contaminação fúngica (ambos 80%) (Figura 3). Enquanto o quarto tratamento (hipoclorito de sódio + cloridrato de ciprofloxacino), apresentou a menor taxa de contaminação bacteriana (0%) e fúngica (40%) mostrando ser a desinfetação mais eficiente com menor taxa de contaminação (Figura 4).

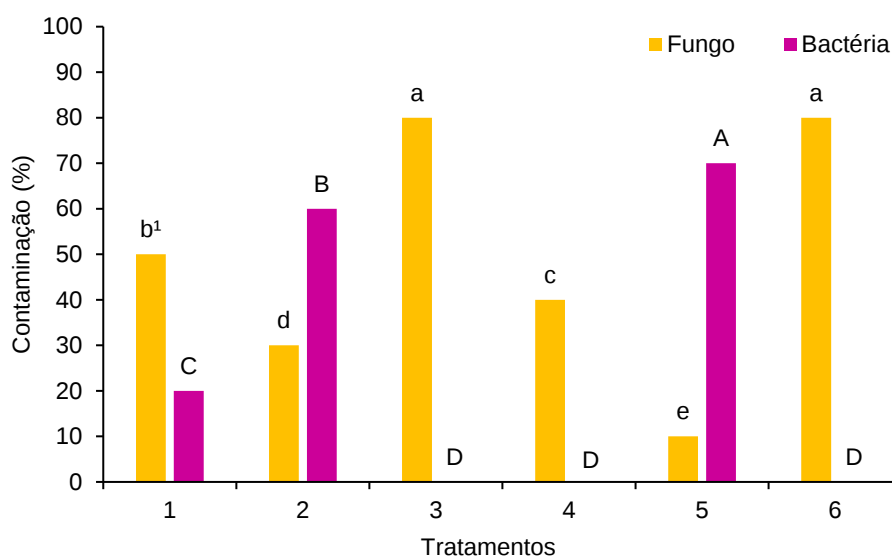
Figura 3 – Ápice caulinar de mamoeiro cultivar Aliança contaminado.



Barra de escala: 1 cm. Fonte: Os autores.

Figura 4. Experimento 2: porcentagem de contaminação nos diferentes tratamentos desinfetantes em ápices caulinares da cultivar Aliança.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Sendo: 1. Dicloroisocianurato de sódio + Cloridrato de ciprofloxacino; 2. Dicloroisocianurato de sódio + Amoxicilina; 3. Dicloroisocianurato de sódio + Rifampicina; 4. Hipoclorito de sódio + Cloridrato de ciprofloxacino; 5. Hipoclorito de sódio + Amoxicilina; 6. Hipoclorito de sódio + Rifampicina. ¹Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Os autores.

Discussão

Apesar dos explantes serem oriundos de plantas adultas obteve-se uma menor taxa de contaminação fúngica no: experimento 1: T3 (10%), T4 (40%) e T5 (40%) e experimento 2: T2 (30%), T4 (40%) e T5 (10%), quando comparada com os dados obtidos por Schmidt e Amaral (2002), onde obtiveram 45% de explantes contaminados por fungos, com explantes retirados de plantas com nove meses no campo.

Vianna (1996), observou o máximo de 70% de controle utilizando rifampicina na desinfestação, assim como Reuveni, Shlesinger e Lavi (1990). Porém, no presente estudo, no experimento 1, ao utilizar rifampicina obteve 100% de controle da contaminação bacteriana, assim como no T3, porém, utilizando cloridrato de ciprofloxacino. Já nos tratamentos T2, T4 e T5 obteve 80, 70 e 70% de controle, respectivamente, sendo considerada uma alta taxa comparado aos resultados dos autores mencionados. No experimento 2, os tratamentos com dicloroisocianurato de sódio + rifampicina, com hipoclorito de sódio + cloridrato de ciprofloxacino ou rifampicina, obtiveram as maiores taxas, com 100% de controle de contaminações bacterianas.

Conclusão

O cloridrato de ciprofloxacino 3 g L⁻¹ por 24 horas, como agente desinfestante, mostrou-se eficiente no controle de fungos e bactérias em ápices caulinares de mamão cultivar Aliança.

Referências

BOBROFF, R. L.; LENZA, J. B.; PEREIRA, G. A. Avaliação de diferentes concentrações de Agrimicina para micropropagação de bananeira IAC 2001. **Uniciências**, v. 13, p. 203-212, 2009.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. **Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas**. In: LUZ, W. C. Revisão anual de patologia de plantas. 10. ed. Passo Fundo: Passo Fundo: RAPP, v. 10, p. 391-407, 2002.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 jul. 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

REUVENI, O.; SHLESINGER, D. R.; LAVI, U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, p. 41-46, 1990.

SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 55-60, 2007.

TEIXEIRA, M. T.; TEIXEIRA, S. L. Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. **Revista Ceres**, v. 51, n. 296, p. 477-483, 2004.

VIANNA, G. R. Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas. 66f. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 1996.

SCHIAVINATO, Y. O. et al. Micropropagação de *Anthurium plowmannii* Croat. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2008.

OLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 36-39, 1983.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. Contaminação e reação morfogênica *in vitro* de explantes do mamoeiro. **Revista Ceres**, v. 49, p. 63-70, 2002.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) (EDITAL FAPES Nº 21/2022 APOIO À INFRAESTRUTURA DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO EM LABORATÓRIOS INTERDISCIPLINARES, Protocolo: 51781.798.19068.30092022, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código financeiro 001, pelo apoio financeiro.