

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE PAU-BRASIL

Mayla Bessa Scotá¹, Gustavo Fernandes Mariano¹, Thalya Campelo Vitor¹, Jairo Pinto de Oliveira², Maurício Lima Dan³, Milene Miranda Praça Fontes¹, Elias Terra Werner¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, mayla_scotta@hotmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, thalyavitor26@gmail.com, mlenenmiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Departamento de Morfologia / CCS, Av. Mal Campos, N° 1468 – Maruípe – 29047-105, Vitória-ES, Brasil, jairo.oliveira@ufes.br.

³INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural) / Fazenda Experimental de Bananal do Norte (FEBN) (20°45'10"S / 41°17'26"W), Pacotuba, Cachoeiro de Itapemirim-ES, Brasil, mauricioldan@gmail.com.

Resumo

A propagação *in vitro* de *Paubrasilia echinata* (pau-brasil) é de interesse ecológico e comercial, principalmente pelo fato de a espécie estar ameaçada de extinção. E, portanto, o objetivo dessa pesquisa foi estabelecer um protocolo eficiente de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de embriões zigóticos (EZ) da espécie *P. echinata*. As sementes foram submetidas a desinfestação com fungicida por 40 minutos (min), álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio a 2,5% (10 ou 20 min), e, em duas soluções de nanopartículas de prata (AgNPS) (20 min). Aos 30 dias foi avaliado a porcentagem de contaminação (%C), porcentagem de sobrevivência (%S), e, comprimento da parte aérea (PA-mm). Aos 60 dias foi avaliado apenas o comprimento da parte aérea. O tratamento com menor taxa de contaminação foi o com 20 min no NaOCl e 20 min em solução de AgNPs com o estabilizador β-quitozan, com apenas 26,66% dos EZ contaminados. A %S foi estatisticamente igual nos tratamentos, tendo a maioria deles ficado acima de 83,33% de sobrevivência. Da mesma forma aos 30 e 60 dias a PA (mm) obteve médias estatisticamente iguais, com uma média de 5,63 mm aos 30 dias, e, 8,41 mm aos 60 dias de incubação.

Palavras-chave: propagação. *Paubrasilia echinata*. Mata Atlântica. endêmica.

Área do Conhecimento: Fisiologia.

Introdução

Paubrasilia echinata (pau-brasil) é uma espécie arbórea, nativa do Brasil e endêmica da Mata Atlântica. Atualmente encontra-se na Lista Vermelha da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza, 1998) de espécies em perigo de extinção, tendo em vista o uso abusivo e desenfreado ao longo das décadas pelas indústrias têxtil e na luteria (LIMA, 1992; WERNER et al., 2007).

Ainda que existam muitos exemplares distribuídos nos fragmentos de Mata Atlântica, e no cultivo em estufas, não se sabe se as regiões onde a espécie é cultivada serão suficientes para manutenção de populações viáveis, tendo em vista a perda de variabilidade genética ao longo do tempo por diferentes fatores, como a perda de habitats, mudanças climáticas e seleção natural (WERNER et al., 2007; SCARANO et al., 2015; MACEDO et al., 2020). Outro agravante é que a espécie possui uma baixa taxa e dificuldade na germinação e propagação natural (BARBEDO et al., 2002).

Dentre as estratégias consideradas eficientes para uma adequada conservação de espécies ameaçadas de extinção é a possibilidade de se utilizar as técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV) na propagação clonal em massa e produção de mudas altamente saudáveis e geneticamente estáveis, (ROUT et al., 2000; WERNER et al., 2009). Todavia, a CTV de *P. echinata* é limitada pelo alto índice de microrganismos presentes em seus explantes, como as sementes e folhas (CAMPOS; COTA, 2015).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

E, portanto, o desenvolvimento de protocolos de desinfestação eficazes e seguros para se trabalhar com *P. echinata* *in vitro* é essencial. Dentre eles, comumente utiliza-se álcool 70%, hipoclorito de sódio (NaOCl), fungicidas e soluções de nanopartículas de prata (AgNPs) (TUNG et al., 2021).

Diante do exposto e da importância ecológica da espécie *P. echinata* objetivou-se com este trabalho avaliar a porcentagem (%) final de contaminação, % de sobrevivência, e, comprimento da parte aérea (mm) a partir de explantes embriões zigóticos submetidos a diferentes protocolos de desinfestação utilizando principalmente dois tipos de soluções de nanopartículas de prata (AgNPs).

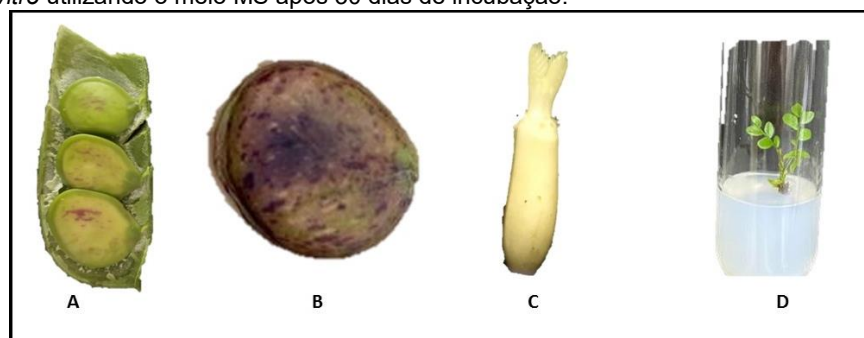
Metodologia

Para a execução do experimento frutos maduros de *P. echinata* foram coletados no arboreto da Fazenda Experimental o INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), localizado no município de Pacotuba, Cachoeiro do Itapemirim, ES.

Em laboratório, as vagens foram abertas (Figura 1A), as sementes retiradas e secas a temperatura ambiente (Figura 1B) e armazenadas em geladeira (2 a 8°C) até o momento do uso. Inicialmente as sementes foram higienizadas com água corrente e algumas gotas de detergente comum por 20 minutos (min). Transcorrido o tempo, foi feita a retirada do tegumento, e, em seguida, imersas por 40 min sob constante agitação em solução de fungicida Orthocide® (princípio ativo CAPTANA) (1g L⁻¹). Em seguida as sementes foram enxaguadas com água corrente 5 vezes e levadas para a câmara de fluxo laminar onde se prosseguiu com a desinfestação. As sementes foram então imersas em álcool 70% (v/v) por 1 min, seguidas de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl - 2 a 2,5% de cloro ativo) acrescidos de algumas gotas de detergente Tween-20® por 10 ou 20 min sob constante agitação, e, após, enxaguadas 7 vezes em água autoclavada para retirada da solução de NaOCl e detergente. Após essa etapa as sementes foram expostas a solução de nanopartículas de prata (AgNPs) contendo o estabilizador β-quitozan (Solução B), ou não (Solução A), por 20 min. Ao final dessas etapas, as sementes foram abertas (Figura 1C) e os embriões zigóticos foram retirados com a ajuda de utensílios esterilizados. Os embriões zigóticos foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos de 30 gL⁻¹ de sacarose, solidificado com 10,0 gL⁻¹ de ágar, e ajuste de pH para 5,7 ± 0,1, em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio. O experimento foi mantido em sala de crescimento a temperatura de 25±2 °C sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) com 36 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiância fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes (20W, Osram®).

O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (Tabela 1), e com 15 repetições por tratamento, sendo repetição com um embrião zigótico por tubo de ensaio. As avaliações foram executadas aos 30 dias para as variáveis de porcentagem de contaminação (%C), porcentagem de sobrevivência (%S) e comprimento da parte aérea (PA em mm). Aos 60 dias foi avaliado apenas o comprimento da parte aérea. Os dados experimentais foram submetidos à ANOVA e após o teste de Tukey para comparação múltipla de médias.

Figura 1- Vagem aberta logo após a coleta (A), retirada e secagem das sementes (B), abertura após desinfestação para obtenção dos embriões zigóticos (C) e desenvolvimento inicial da plântula de *P. echinata* (D) na cultura *in vitro* utilizando o meio MS após 30 dias de incubação.



A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Fonte: o autor.

Tabela 1- Tratamentos a partir das combinações e concentrações dos reagentes químicos desinfetantes utilizados no protocolo de desinfestação dos embriões zigóticos obtidos das sementes de *P. echinata*.

Tratamentos	NaOCl	Solução A de AgNPs	Solução B de AgNPs
T1	10 min	-	-
T2	20 min	-	-
T3	10 min	20 min	-
T4	20 min	20 min	-
T5	10 min	-	20 min
T6	20 min	-	20 min

Fonte: o autor.

Resultados

Com um *P-Valor* significativo ($p \leq 0,05$), os resultados da variável % de contaminação indicam um efeito estatisticamente significativo, conforme indicado na Tabela 2. Os resultados das médias das variáveis % de contaminação, % de sobrevivência e comprimento da parte aérea dos embriões estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2- Resultados da análise de variância (*P-Valor*) das variáveis % de contaminação, % de sobrevivência e parte aérea (cm) no desenvolvimento *in vitro* dos embriões zigóticos obtidos das sementes de *P. echinata* cultivados em meio MS submetidas a diferentes protocolos de desinfestação.

P-Valor					
Anova	GL	% de contaminação 30 dias	% de sobrevivência 30 dias	Parte aérea - cm 30 dias 60 dias	
Tratamentos	5	6.5165e-06	0.12847	0.12503	0.21311
CV		11.85	35.95	51.42	50.47

Fonte: o autor. Legend a: GL= grau de liberdade; CV= coeficiente de variação. Os dados foram submetidos a análise de variância, após atender as pressuposições de normalidade e homogeneidade pelo teste de ShapiroWilk.

Tabela 3- Resultados da % de contaminação, % de sobrevivência e comprimento da parte aérea (mm) dos embriões zigóticos das sementes de *P. echinata* cultivados em meio MS *in vitro* submetidos a diferentes protocolos de desinfestação aos 30 dias e 60 dias de incubação.

Variáveis	T1	T2	T3	T4	T5	T6
% de contaminação	93,33 a	80 ab	60 b	80 ab	73,33 ab	26,66 c
% de sobrevivência	33,33 a	100 a	83,33 a	100 a	83,33 a	91,66 a
Parte aérea – 30 dias	1,16 a	5,36 a	7,95 a	7,42 a	5,04 a	6,88 a
Parte aérea – 60 dias	4,11 a	7,30 a	11,05 a	13,04 a	5,12 a	9,87 a

Fonte: o autor. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A partir das análises estatística (Tabela 2) é possível observar efeito significativo na % de contaminação dos EZ e as médias descritas na Tabela 3 indicam que o melhor protocolo de desinfestação para o desenvolvimento inicial *in vitro* dos EZ de *P. echinata* é o protocolo T6 (NaOCl 20 min + Solução B de AgNPs 20 min), onde, apresentou contaminação em apenas 26,66% dos explantes. Já os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 são estatisticamente iguais, e, estes, com elevado índice de contaminação quando avaliado ao final de 30 dias, tendo o T1 (93,33%) a maior % de contaminação.

A variável % de sobrevivência avaliado aos 30 dias não teve efeito significativo na análise estatística, e, portanto, suas médias são consideradas iguais (Tabela 3). Todavia, observa-se que os tratamentos T2 (100%), T4 (100%) e T6 (91,66) obtiveram médias acima de 90% de sobrevivência dos EZ de *P. echinata* cultivados em meio MS.

Da mesma forma, a variável de comprimento da parte aérea não obteve significância nas análises estatísticas (Tabela 2), e, portanto, suas médias são consideradas iguais aos 30 e 60 dias de avaliação (Tabela 3). Aos 30 dias de incubação a média dos embriões variaram entre 1,16 mm (T1) e 7,95 mm (T3). E, aos 60 dias entre 4,11 mm (T1) 13,04 mm (T4). O tratamento T6 onde apresentou a melhor % de desinfestação obteve médias de crescimento aéreo de 6,88 mm (60 dias) e 9,87 mm (60 dias).

Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 3 corroboram com diferentes literaturas já publicadas, onde, evidenciaram que a combinação de reagentes químicos como o álcool, hipoclorito, fungicidas e solução de AgNPs são eficientes para a desinfestação *in vitro* de explantes coletados diretamente do campo (FERREIRA et al., 2009; BUTT et al., 2013; ARRUDA et al., 2019).

As ações dos reagentes químicos estão basicamente ligadas em ações diretas na estrutura celular dos micro-organismos. O uso do NaOCl está ligado a uma reação nas proteínas da membrana celular, o que leva a formação de composto tóxicos e inibição de algumas enzimas essenciais (DONINI et al., 2022). O uso do Tween otimiza a penetração do NaOCl nas membranas celulares em virtude de sua ação como um detergente. O uso do etanol, geralmente em 70% e 80% é em virtude de sua ação germicida, surfactante e pela eficiência em dissolução de moléculas de gordura, auxiliando dessa forma a ação dos demais reagentes químicos (SILVA et al., 2012; ARRUDA 2019). As solução de AgNPs tem sido estudadas na inibição de patógenos (TUNG et al., 2018; TUNG et al., 2021), e, na otimização do desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies de plantas (TYMOSZUK et al., 2019), todavia, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos que essas soluções podem causar no desenvolvimento morfofisiológico das plantas. As soluções de AgNPs interferem nos processos metabólicos essenciais, danificam a estrutura da membrana celular, e, até mesmo, penetram e dispersam biofilmes bacterianos.

A exposição dos explantes aos reagentes químicos viriam de acordo com a espécie e explantes utilizado. Além disso, a espécie em estudo, *P. echinata* é fortemente marcada pela presença de patógenos endofíticos, e nesse caso, os métodos de desinfestação devem ser mais rigorosos e até mesmo associações entre eles, como no caso desse estudo onde as melhores porcentagens de desinfestação foram observadas quando os explantes foram associados a todos os reagentes químicos (NASCIMENTO et al., 2007; CAMPOS; COTA, 2015). Todavia, o desenvolvimento das plântulas pode ser afetado pela alta exposição dos embriões aos reagentes químicos, bem como sua sobrevivência, tendo em vista que esses reagentes podem oxidar os explantes.

Até o momento são poucos os estudos de propagação *in vitro* com *P. echinata*, e muito deles estão voltados para a desinfestação de folíolos jovens e indução de embriões somáticos *in vitro* (WERNER et al., 2009; NENARTAVIS et al., 2010). No geral, estes autores obtiveram sucesso na desinfestação *in vitro* utilizando os reagentes álcool 70% (1 min) e solução de NaOCl (20 min). Em estudo com *Caesalpinia pyramidalis* (família Fabaceae) foi utilizado álcool 70% (1 min), fungicida Derosal (2 mL⁻¹) por 10 min, e, solução de NaOCl por 15 min para a multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais, o mesmo obteve indução de brotos sem contaminantes utilizando esses reagentes, todavia, não divulgou a porcentagem final de explantes contaminados.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

A desinfestação dos EZ de *P. echinata* foi eficiente quando submetida ao protocolo onde estão associados todos os reagentes químicos, como visto no tratamento T6 onde as sementes foram expostas a exposição em solução de fungicida (40min), álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio (20 min) e solução de AgNPs (20 min) obtendo apenas 26,66% de contaminação dos embriões. O desenvolvimento da parte aérea assim como a sobrevivência não obteve diferenças significativas entre os tratamentos, portanto, o uso do protocolo descrito para T6 pode ser mais bem utilizado em virtude da sua alta taxa de desinfestação.

Referências

- ARRUDA, Ana Luiza et al. Estabelecimento in vitro de sementes de *Psidium cattleianum* Sabine. **Acta Biológica Catarinense**, v. 6, n. 4, p. 105-113, 2019.
- BARBEDO, CLAUDIO J.; BILIA, DENISE AC; FIGUEIREDO-RIBEIRO, RITA DE CÁSSIA L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, p. 431-439, 2002.
- BUTT, MADIHA; USMAN, MUHAMMAD; FATIMA, BILQUEES. Enhanced Seed Germination and Callogenesis under long days using Leaf Disc as Explant in Guava cultivars. **Biologia (Pakistan)**, v. 59, n. 2, p. 293-298, 2013.
- CAMPOS, F.F.; COTA, B.B. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110 (1), Feb 2015.
- DONINI, L. P. et al. FERREIRA, Maria das Graças Rodrigues et al. Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Revista Saber Científico**, v. 2, n. 2, p. 56-62, 2009. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 517-522, 2022.
- FERREIRA, Maria das Graças Rodrigues et al. Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Revista Saber Científico**, v. 2, n. 2, p. 56-62, 2009.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/33974/9818224>>. Acesso em: 10 de março de 2023.
- LIMA, H. C. Aspectos botânicos do pau-brasil. **Viagem à terra do pau-brasil**, p. 23-38, 1992. MACEDO, Tahysa Mota et al. Climate signals in tree rings of *Paubrasilia echinata* (Leguminosae:Caesalpinioidea) from the Atlantic Forest of Brazil. **Trees**, v. 34, p. 337-347, 2020.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NASCIMENTO, P.K.V.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G., Desinfestação e Germinação in vitro de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 2, p.141- 143, 2007.
- NENARTAVIS, Erick Guimarães et al. Estudos sobre indução, manutenção e estabilidade genética da calogênese in vitro de *Caesalpinia echinata* Lam.(Pau-brasil). 2010.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ROUT, Gyana R.; SAMANTARAY, Sanghamitra; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SCARANO, Fabio Rubio; CEOTTO, Paula. Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2319-2331, 2015.

SILVA, Marcela Liege da et al. Desinfestação e estabelecimento de sementes de Myrciaria dubia (HBK) McVaugh germinadas in vitro. 2012.

TUNG, Hoang Thanh et al. A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes. **Scientia Horticulturae**, v. 232, p. 153-161, 2018.

TUNG, Hoang Thanh et al. Silver nanoparticles improved explant disinfection, in vitro growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (Fragaria x ananassa). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 393-403, 2021.

TYMOSZUK, Alicja; MILER, Natalia. Silver and gold nanoparticles impact on in vitro adventitious organogenesis in chrysanthemum, gerbera and Cape Primrose. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108766, 2019.

WERNER, Elias Terra et al. Controle da calogênese do pau-brasil in vitro. **Revista Árvore**, v. 33, p. 987-996, 2009.

WERNER, Elias Terra et al. Indução da calogênese de Caesalpinia echinata Lam.(pau-brasil) in vitro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1053-1055, 2007.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, e, à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo suporte financeiro.