

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

USO DE DIFERENTES AGENTES NA DESCONTAMINAÇÃO E CULTIVO *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, milenemiranda@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

O cultivo *in vitro* de *Paubrasilia echinata* (pau-brasil) apresenta relevância tanto do ponto de vista comercial quanto ecológico em virtude da ameaça de extinção em que a espécie se encontra. Dessa forma, o objetivo deste estudo consistiu em desenvolver um protocolo de desinfestação eficaz para crescimento e desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos (EZ) da espécie *P. echinata* com uso de fungicida, antibiótico e nanopartícula de prata. A sementes foram submetidas a uma desinfestação com fungicida Orthocide® (1g L⁻¹) por 40 minutos (min), álcool 70% (v/v) (1 min), hipoclorito de sódio a 2,5% c.a. (20 min), imerso em duas soluções diferentes de nanopartículas de prata (AgNPS) (20 min) e imersas ou não em solução de antibiótico contendo 1 mL L⁻¹ ou 2 mL L⁻¹ de Tetraciclina por 20 min. Aos 30 dias foi avaliado a porcentagem de contaminação (%C), porcentagem de sobrevivência (%S), e comprimento da parte aérea (PA-mm). Os melhores protocolos de desinfestação foram T1 (0%), T2 (15%), T3 (10%) e T6 (0%), estatisticamente iguais entre si. Já para a variável PA (mm), a melhor média observada foi em T2 com 11,51 mm de comprimento.

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

Área do Conhecimento: Fisiologia.

Introdução

O bioma Mata Atlântica possui elevado índice de biodiversidade de espécies, todavia, o desmatamento ao longo dos séculos o colocou em um alto grau de ameaça e risco (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2022). Portanto, é essencial o investimento em estratégias de conservação, propagação e reflorestamento de espécies que habitam este ambiente, como o pau-brasil (*Paubrasilia echinata*). Esta 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).

Embora existam muitos exemplares distribuídos nos fragmentos de Mata Atlântica e no cultivo em estufas, não se pode afirmar com certeza se as regiões onde a espécie é cultivada serão suficientes e adequadas para a manutenção de populações viáveis. Isso se deve à possibilidade de perda de variabilidade genética ao longo do tempo, devido a diversos fatores, como, destruição dos habitats, mudanças climáticas e seleção natural (WERNER et al., 2007, SCARANO et al., 2015 MACEDO et al., 2020). Além disso, a espécie possui baixa taxa e dificuldade de germinação e propagação natural (BARBEDO et al., 2002).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV), como a micropropagação *in vitro*, é considerada como uma ferramenta prática e eficaz para atender a demanda de mudas com elevado nível de qualidade, uma vez que tal estratégia possibilita a propagação em menor tempo, plantas com estabilidade genética, além de não dependerem do clima para se multiplicarem, tendo em vista o ambiente controlado em que são desenvolvidas (ROUT et al., 2000; WERNER et al., 2009; WEN et al., 2020). 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). E, portanto, o desenvolvimento de protocolos de desinfestação eficaz e seguro para se trabalhar com *P. echinata in vitro* é essencial. Comumente os protocolos de desinfestação envolvem a utilização do álcool 70%, hipoclorito de sódio (NaOCl), fungicidas, antibióticos e soluções de nanopartículas de prata (AgNps) (TUNG et al., 2021). Além disso, é necessário estabelecer o meio de cultivo adequado para espécies arbóreas, bem como suas concentrações. E, mesmo com esses cuidados, os trabalhos de CTV requerem muitos estudos, pois, mesmo que as taxas de desinfestação sejam eficazes, muitos explantes apresentam altas taxas de oxidação, desenvolvimento lento e até mesmo anormal, com modificações morfofisiológicas.

Diante do exposto e da importância ecológica e comercial da espécie *P. echinata* objetivou-se com este trabalho avaliar a porcentagem final de contaminação e sobrevivência, e, comprimento da parte aérea (mm) de embriões zigóticos submetidos a diferentes protocolos de desinfestação utilizando fungicida Orthocide®, antibiótico Tetraciclina e nanopartículas de prata (AgNps), além de diferentes concentrações do meio de cultura MS.

Metodologia

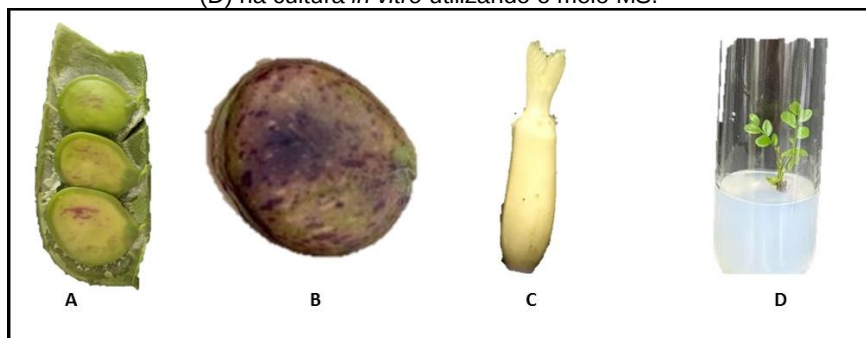
Para a execução do experimento, frutos maduros de *P. echinata* foram coletados no arboreto da Fazenda Experimental o INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), localizado no município de Pacotuba, Cachoeiro do Itapemirim, ES.

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 dos tegumentos, 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 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, ou não, a solução de antibiótico Tetraciclina contendo 1 mL L⁻¹ ou 2 mL L⁻¹ por 20 min, e, por último imersão por 20 min em solução de nanopartículas de prata (AgNps) contendo o estabilizador β-quitozan. Após esses processos as sementes foram abertas (Figura 1C) e os embriões zigóticos retirados com a ajuda de utensílios esterilizados. Os embriões zigóticos foram inoculados em meio MS (100%) ou MS½ força, acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 10,0 g L⁻¹ de ágar, e ajuste de pH para 5,7 ± 0,1, em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio. Parte das sementes que não foram imersas nas soluções de antibiótico, foram incubadas nos mesmos meios citados acima, todavia, acrescidos de 1 mL L⁻¹ ou 2 mL L⁻¹ de Tetraciclina adicionados no momento do preparo 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 7 tratamentos (Tabela 1), e com 20 repetições por tratamento, sendo a 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.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

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.



Fonte: o autor.

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

Tratamentos	Etapas de desinfestação	Meios de cultura
T1	F 40 min + A 1 min + H 20 min + SN 20 min + MA2	MS 100%
T2	F 40 min + A 1 min + H 20 min + BA2 20 min + SN 20 min	
T3	F 40 min + A 1 min + H 20 min + BA1 20 min + SN 20 min	
T4	F 40 min + A 1 min + H 20 min + SN 20 min + MA2	
T5	F 40 min + A 1 min + H 20 min + BA2 20 min + SN 20 min	MS½ força
T6	F 40 min + A 1 min + H 20 min + BA1 20 min + SN 20 min	
T7	F 40 min + A 1 min + H 20 min + SN 20 min + MA1	

Fonte: o autor. Legenda: F= fungicida; A= álcool 70%; H= solução de hipoclorito de sódio; SN= solução de nanopartículas de prata; BA1= banho das sementes com solução de antibiótico contendo 1 mL⁻¹ de Tetraciclina; BA2= banho das sementes com solução de antibiótico contendo 2 mL⁻¹ de Tetraciclina; MA1= meio de cultura com 1 mL⁻¹ de Tetraciclina; MA2= meio de cultura com 2 mL⁻¹ de Tetraciclina.

Resultados

Com um *P-Valor* significativo ($p \leq 0,05$), os resultados da variável % de contaminação ($p = 0.00011791$) e comprimento da PA-mm ($p = 0.013871$) indicam um efeito estatisticamente significativo. Os resultados de % de sobrevivência não obteve significância ($p = 0.07721$). Os resultados das médias das variáveis % de contaminação, % de sobrevivência e comprimento da parte aérea dos embriões estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados da % de contaminação, % de sobrevivência e comprimento da parte aérea (mm) dos embriões zigóticos das sementes de *P. echinata* aos 30 dias de incubação cultivados em meio MS (100%) e MS½ força sobre diferentes protocolos de desinfestação.

Variável	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
%C	0 c	15 abc	10 bc	30 a	25 ab	0 c	20 ab
%S	75% a	83,75% a	90% a	87,5% a	81,25% a	80% a	56,25% a
PA-mm	6,71 ab	11,51 a	6,31 ab	6,47 ab	7,90 ab	4,61 b	7,11 ab

Fonte: o autor. Legenda: %C = porcentagem de contaminação; %S = porcentagem de sobrevivência; PA-mm = comprimento de parte aérea. 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 é possível observar efeito significativo apenas nas variáveis %C e PA (mm) dos EZ. As médias descritas na Tabela 2 indicam que os melhores protocolos, nesse caso estatisticamente iguais entre si, para a desinfestação *in vitro* dos EZ de *P. echinata* são os protocolos T1 (0%), T2 (15%), T3 (10%) e T6 (0%). Já para a variável PA a melhor média observada foi em T2 com 11,51 mm de comprimento, seguida pelo tratamento T5 (7,90 mm), T7 (7,11 mm), T1 (6,71 mm), T4 (6,47 mm) e T3 (6,31 mm), estatisticamente iguais entre si. Para a variável de sobrevivência (%S) as médias foram estatisticamente iguais, obtendo porcentagens acima de 80% de sobrevivência nos tratamentos de T2 a T6, 75% em T1, e, 56,25% no tratamento T7.

Discussão

Os dados expostos na Tabela 2 confirmam as conclusões de diferentes literaturas publicadas. Essas fontes ressaltam que a utilização conjunta de reagentes químicos álcool 70%, hipoclorito, fungicidas, soluções de AgNPs e antibióticos, demonstra eficácia na desinfestação *in vitro* de explantes coletados diretamente do campo, especialmente de espécies lenhosas que rotineiramente possuem uma maior quantidade de contaminantes exógenos e endógenos (FERREIRA et al., 2009; BUTT et al., 2013; ARRUDA et al., 2019).

As bactérias endógenas, introduzidas de maneira sistêmica junto aos explantes, impõem restrições significativas na etapa de estabelecimento em ambiente controlado de plantas lenhosas, acarretando perda de tempo, recursos financeiros e material vegetal. Os agentes invasores podem disputar nutrientes do meio de cultivo com os explantes e liberar compostos tóxicos que têm potencial para resultar na morte das plantas (PEREIRA et al., 2014).

Entretanto, é crucial incorporar a outros tratamentos de desinfestação substâncias químicas adicionais, como hipoclorito de sódio, álcool, soluções contendo nanopartículas de prata (AgNPs) e a inclusão de antibióticos no meio de cultura, como demonstrado neste estudo.

A exposição dos explantes ao álcool a 70% está relacionada com seu efeito desidratante nas células microbianas, acarretando danos em suas membranas e proteínas, o que culmina na eliminação de parte dos micro-organismos presentes nos explantes (FREITAS et al., 2014). A solução de NaOCl possui ação oxidativa, a qual desintegra as proteínas presentes nas membranas microbianas, provocando desordem estrutural e assim impedindo a proliferação de bactérias, fungos e vírus (DONINI, L. P. et al.; 2022). 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.

O antibiótico baseado em tetraciclina apresenta, em sua estrutura básica, um anel naftaceno que ataca as bactérias, interferindo na síntese de proteínas e bloqueando o receptor na subunidade ribossomal 30S que se liga ao t-RNA durante o processo de tradução genética. Este antibiótico, de origem natural, é caracterizado por seu amplo espectro de ação e caráter bacteriostático, ou seja, ele inibe o desenvolvimento das bactérias (ANVISA, 2007; MADIGAN et al., 2016).

Apesar de os antibióticos serem ferramentas de grande relevância para conter as bactérias endógenas, é importante observar que alguns destes antibióticos podem ter efeito bacteriostático, ao invés de bactericida, podendo ser prejudiciais para as plantas (Grattapaglia e Machado, 1990). Contudo, quando há interesse na preservação de determinados clones, torna-se necessário administrar o controle dessas bactérias utilizando antibióticos específicos. Não obstante, a maioria das bactérias endógenas apresentam resistência a certos antibióticos por razões ainda desconhecidas (RAMAKRISHNA et al., 2019).

Conclusão

A partir dos resultados apresentados, verificou-se que o protocolo de desinfestação estabelecido associados a exposição dos explantes em diferentes tempos em solução de NaOCl, solução de AgNPs contendo o estabilizante β -quitosan e antibióticos, sendo T1 (F 40 min + A 1 min + H 20 min + SN 20 min + MA2), T2 (F 40 min + A 1 min + H 20 min + BA2 20 min + SN 20 min), T3 (F 40 min + A 1 min +

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

H 20 min + BA1 20 min + SN 20 min) e T6 (F 40 min + A 1 min + H 20 min + BA1 20 min + SN 20 min) foi viável para a desinfestação e desenvolvimento in vitro de *P. Echinata*.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Antimicrobianos, e uso clínico**. Disponível: <https://www.gov.br/anvisa/pt.br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-6-deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica/view>. [S.l.:s.n.], 2020. Acesso em: 8 ago. 2023.

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. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **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.

FREITAS, Cristiane Almiron Batista de et al. **Estabelecimento in vitro de *Annona crassiflora* e *Annona squamosa* utilizando segmentos nodais**.; 2014.

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.

MADIGAN. M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

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.

PEREIRA, G. A.; BOLIANI, A. C. FURLANI JÚNIOR, E. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira ‘Thap maeo’. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, p. 299-305, 2014.

Ramakrishna, W., Yadav, R. & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, 138, 10- 18.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

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.

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.

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.

WEN, Shu-Sheng; CHEN, Lan; TIAN, Ru-Nan. Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*): A review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 141, p. 1-14, 2020.

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.

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

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.