DESINFESTAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E CULTIVO *IN VITRO* DE *PAUBRASILIA ECHINATA*

Thalya Campelo Vitor, Mayla Bessa Scotá, Gustavo Fernandes Mariano, Aline dos Santos Bergamin, Esdras Mendes Cunha, Milene Miranda Praça Fontes, Elias Terra Werner.

Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, thalyavitor26@gmail.com; mayla_scotta@hotmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, alinebergamin258@hotmail.com, esdrasmbio@gmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

Resumo

Paubrasilia echinata (pau-brasil), é uma espécia arbórea, nativa do Brasil e endêmica da Mata Atlântica. Atualmente se encontra ameaçada de extinção devido ao extrativismo ao longo dos séculos. A floração da espécie é anual, e, possui sementes recalcitrantes, dificultando a propagação. Dito isso, a utilização de técinicas como a cultura de tecidos vegetais (CTV) *in vitro* são ferramentas promissoras para a propagação em larga escala de espécies ameaçadas, como o pau-brasil. O objetivo deste estudo foi testar a eficácia dos reagentes desinfetantes Hipoclorito de Sódio (NaClO) e Nanopartículas de Prata (NPsAg) em sementes de pau-brasil em diferentes tempos (5, 15, 20 e 30 min) e concentração (100% e 60%) para obtenção dos embriões zigóticos (EZ), e, o estabelecimento inicial de plântulas *in vitro* a partir da incubação dos EZ de pau-brasil. A desinfestação com NaClO + NPsAg obtiveram as menores médias de contaminação, ficando abaixo de 30% em todos os tratamentos, exceto no tempo de 15 min (60%). A sobrevivência dos explantes foi baixa, com médias de 53% (NaClO+NPsAg), 21% (NPsAg), e 22% (NaClO).

Palavras-chave: extinção.micropropagação.pau-brasil.cultura de tecidos vegetais.

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 textil e na luteria (Lima, 1992; Werner et al., 2007).

Embora haja uma grande quantidade de espécimes distribuídos pelos fragmentos da Mata Atlântica e em cultivo em estufas, não se tem certeza de que as áreas de cultivo serão suficientes para garantir a sobrevivência de populações viáveis. Isso se deve à perda gradual de variabilidade genética, causada por diversos fatores como destruição de habitats, mudanças climáticas e seleção natural (Werner et al., 2007; Scarano et al., 2015). Além disso, a espécie enfrenta outros desafios significativos. Sua floração ocorre anualmente e suas sementes são recalcitrantes, o que significa que perdem a viabilidade apenas alguns dias após a dispersão (Barbedo et al., 2002). Essa característica é um fator limitante crucial para sua propagação, tornando ainda mais difícil a manutenção e expansão das populações naturais.

Portanto, as variações e dificuldades no processo de armazenamento, germinação e propagação natural de *P.echinata*, somado ao fato da espécie estar ameaçada de extinção, é indispensável que protocolos de coleta, armazenamento de sementes, e, principalmente, propagação da espécie sejam otimizados e postos em prática.

Uma das estratégias consideradas eficazes para a conservação adequada de espécies ameaçadas de extinção é a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV) para propagação clonal em massa e produção de mudas saudáveis e geneticamente estáveis (Rout et al., 2000; Werner et al., 2009). No entanto, a CTV para *P. echinata* é dificultada pelo alto nível de microrganismos presentes em seus explantes, como sementes e folhas (Campos; Cota, 2015). Por isso, é crucial desenvolver protocolos de desinfecção eficientes e seguros para o cultivo *in vitro* de *P. echinata*. Entre os métodos comumente utilizados estão o álcool a 70%, hipoclorito de sódio (NaOCl), fungicidas e soluções de nanopartículas de prata (AgNPs) (Tung et al., 2021).

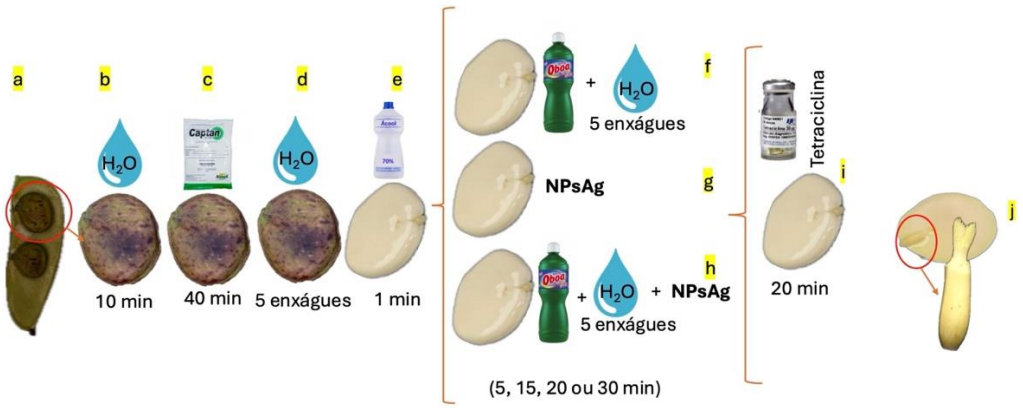
Diante do exposto e da importância ecológica da espécie *P. echinata* objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência dos desinfetantes NaClO e NPsAg na porcentagem (%) de contaminação e (%) de sobrevivência de embriões zigóticos (EZ) cultivados *in vitro* de *P. echinata* a fim de estabelecer estabelecimento plântulas saudáveis e livres de contaminantes para o uso na micropropagação da espécie.

Metodologia

Bagas de pau-brasil com aproximadamente 10 semanas após a floração foram coletadas de um arboreto localizado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória. As bagas foram utilizadas para os experimentos de germinação e estabelecimento de plântulas *in vitro* a partir de embriões zigóticos obtidos das sementes.

As bagas com aproximadamente 10 (Fig. 1a) semanas foram abertas para a retirada das sementes (Fig. 1b), e, estas, foram lavadas por aproximadamente 10 min em água e detergente neutro (Fig. 1b) para a retirada de sujidades. Em seguida, as sementes foram imersas em solução fungicida 1 g L^{-1} (Captan) por 40 min (Fig. 1c), enxaguadas em média 5x em água corrente (Fig. 1d), os tegumentos foram retirados ao final. Posteriormente, em fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto (Fig. 1e). Nesse momento as sementes foram separadas em três porções e estas seguiram as seguintes etapas de desinfestação: Imersão por 5, 15, 20 ou 30 min em NaClO (QBoa®)(100% e 60%) contendo de 2 a 2,5 de cloro ativo (Fig. 1f), seguida por 5 enxágues em água autoclavada estéril (Fig. 1f); imersão em solução de NPsAg (100% e 60%) por 5, 15, 20 ou 30 min (Fig 1g); imersão em solução de NaClO (100% e 60%), seguida por 5 enxágues em água autoclavada e em seguida imersas em solução de NPsAg (100% e 60%) nos tempos de 5, 15, 20 ou 30 min (Fig. 1h). Ao final desses 3 processos de desinfestação, as sementes de forma independente, foram imersas em solução de antibiótico (Tetraciclina) 2 mL L^{-1} (20 min) (Fig. 1i). As sementes foram abertas e os EZ inoculados (Fig. 1j) em potes de vidro com 60 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) 4,4 g L^{-1}, acrescidos de sacarose (30 g L^{-1}), ágar (7,5 g L^{-1}), e, ajuste de pH em 5,7 ± 0,1. O meio foi suplementado com os RCVs 6-Benzilaminopurina (BAP) (2,5 mg L^{-1}) e ácido giberélico (GA_3) (1 g L^{-1}) (Figura 1).

Figura 1. Desinfestação de sementes de pau-brasil coletadas aproximadamente 10 semanas após a floração para obtenção dos embriões zigóticos para inoculação e estabelecimento de plântulas *in vitro*. Legenda: (**a**) bagas; (**b**) enxágue em água; (**c**) imersão em solução de fungicida; (**d**) enxágue com água autoclavada; (**e**) imersão em álcool 70%; (**f**, **g** e **h**) imersão das sementes nos diferentes reagente e tempos de exposição; (**i**) imersão em solução de antibiótico Tetraciclina (2 ml L^{-1}); (**j**) inoculação dos embriões zigóticos.



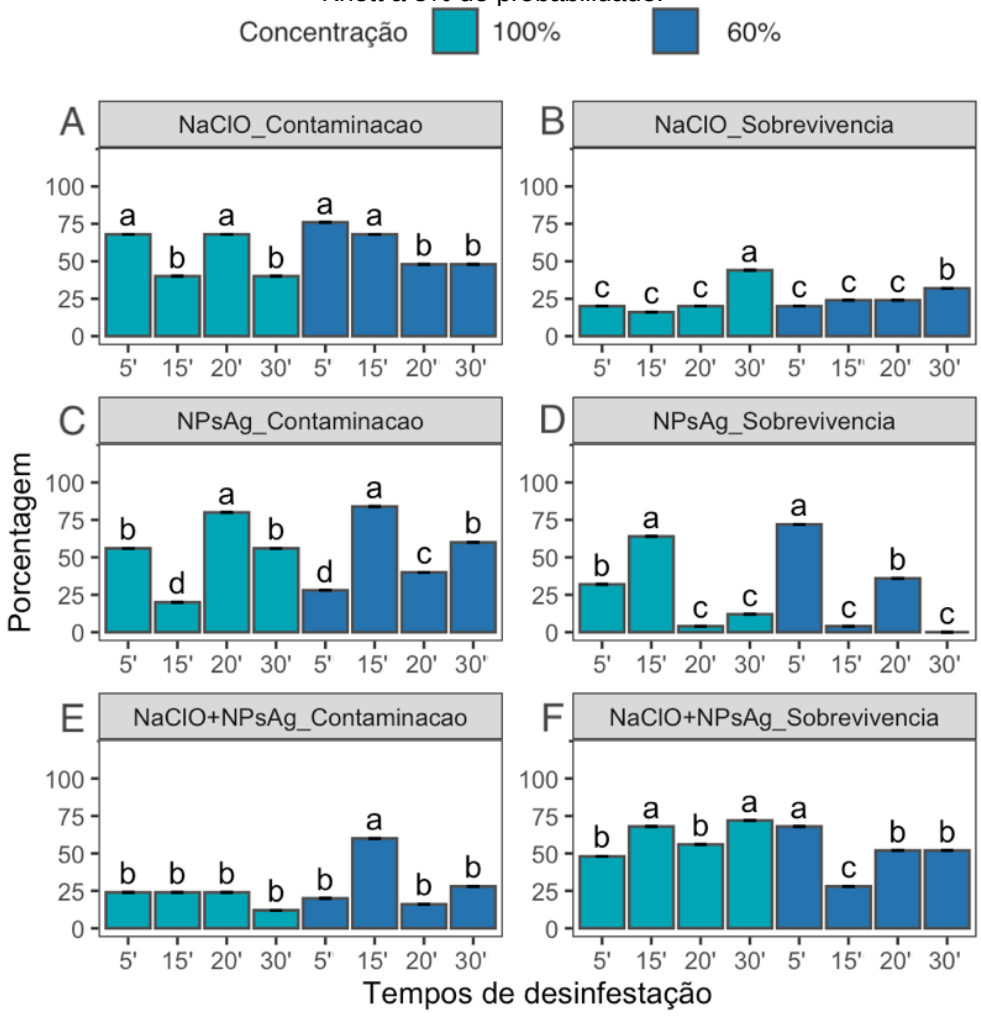
Fonte: O autor.

O experimento foi mantido por 30 dias em sala de crescimento a temperatura de 25±2 ºC 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 25 repetições por tipo tratamento. As variáveis avaliadas foram porcentagem (%) de contaminação e % de sobrevivência.

Resultados

Todos os tratamentos avaliados nos testes de desinfestação de EZ de pau-brasil apresentaram *p-valor* significativo (<0,05), indicando que os resultados são estatisticamente relevantes. Os resultados das variáveis de contaminação e sobrevivência dos embriões zigóticos estão descritos na Figura 2.

Figura 2. Resultados de contaminação e sobrevivência dos embriões zigóticos de pau-brasil após protocolo de desinfestação. Porcentagem de contaminação (**A**, **C** e **E**). Porcentagem de sobrevivência (**B**, **D** e **F**). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Fonte: O autor.

Os tratamentos de desinfestação utilizando o reagente NaClO (Fig. 2A), para os explantes de embriões zigóticos, com os tempos de 15' e 30'(100%), e, 20' e 30'(60%) são estatisticamente iguais entre si, apresentando as menores médias de contaminação, entre 40 e 48% dos explantes contaminados. Já a sobrevivência (Fig. 2B) teve a melhor média no tempo de 30' (100%) com 44% de

sobrevivência dos embriões que não apresentaram contaminação. A desinfestação com NPsAg (Fig. 2C) no tempo de 15' (100%) e 5' (60%) foram estatisticamente iguais entre si, com 20% e 28% respectivamente, dos embriões zigóticos contaminados. A sobrevivência (Fig. 2D) dos embriões expostos a solução de NPsAg obteve as melhores médias nos tempos de 15'(100%) com 64% e 5' (60%) com 72%. Quando avaliada a interação entre os reagentes (Fig. 2E), com exceção do tratamento de 15'(60%), todos foram estatisticamente iguais entre si, com as menores médias de contaminação, ficando entre 12% no tempo de 30' (100%) e 28% no tempo de 30' (60%). A sobrevivência dos embriões (Fig. 2F) quando submetidos aos dois reagentes desinfetantes, NaClO e NPsAg, foi estatisticamente igual entre os tempos de 15' (100%) com 68% de sobrevivência, e, no tempo de 5' (60%) com 72% dos embriões sobrevivendo ao protocolo de desinfestação.

Figura 3. Plântulas germinadas a partir de EZ após 30 dias de incubação em meio MS (4,4 g L^{-1}) acrescidos de sacarose (30 g L^{-1}), ágar (7,5 g L^{-1}), BAP (2,5 mg L^{-1}), GA_3 (1 g L^{-1}) e, ajuste de pH em 5,7 ± 0,1. **Legenda:** plântulas germinadas a partir de EZ expostos as soluções de NaClO (**a**), NPsAg (**b**) e expostas aos dois reagentes NaClO + NPsAg (**c**). Plântulas germinadas a partir da inoculação de embriões zigóticos expostas às soluções de NaClO.

Discussão

Os resultados exibidos na Figura 2 estão em concordância com a literatura existente, que demonstra que a combinação de reagentes químicos, como álcool, hipoclorito, fungicidas e soluções de AgNPs, é eficaz na desinfestação *in vitro* de explantes obtidos diretamente do campo (Ferreira et al., 2009; BUTT et al., 2013; Arruda et al., 2019).

Os efeitos desses reagentes químicos estão diretamente relacionados à sua atuação sobre a estrutura celular dos microrganismos. O NaClO, por exemplo, reage com as proteínas da membrana celular, resultando na formação de compostos tóxicos e na inibição de enzimas essenciais (Donini et al., 2022). O etanol, normalmente utilizado em concentrações de 70% a 80%, possui propriedades germicidas e surfactantes, além de dissolver moléculas de gordura, o que potencializa a ação dos outros reagentes (Silva et al., 2012; Arruda, 2019). As soluções de NPsAg têm um impacto significativo nos processos metabólicos essenciais, danificam a membrana celular e podem penetrar e dispersar biofilmes bacterianos (Tung et al., 2018; Tung et al., 2021). No entanto, os possíveis efeitos tóxicos dessas soluções no desenvolvimento morfofisiológico das plantas ainda são pouco compreendidos.

A eficácia da desinfestação dos explantes depende do tipo de espécie e do explante utilizado. No caso de *P. echinata*, que é particularmente suscetível a patógenos endofíticos, é necessário adotar métodos de desinfestação mais rigorosos e frequentemente combinar diferentes reagentes, corroborando com os resultados apresentados na Fig. 2E onde se nota as menores % de contaminação. Sendo assim, é essencial otimizar tanto o tempo de exposição quanto as concentrações dos reagentes para desenvolver um protocolo de desinfestação eficaz que preserve o desenvolvimento saudável dos embriões.

Conclusão

Os melhores resultados de desinfestação foram alcançados quando todos os reagentes químicos foram utilizados em conjunto. Apesar da melhoria observada na desinfestação dos embriões, o crescimento anormal das plântulas sugere a necessidade de ajustes no protocolo.

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.

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 (LeguminosaeCaesalpinioidea) 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.

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× ananassa). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 393-403, 2021.

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.