

DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E CULTIVO *IN VITRO* DE *PAUBRASILIA ECHINATA*

Thalya Campelo Vitor, Mayla Bessa Scotá, Gustavo Fernandes Mariano, Geisiele Silva Martins, Katia Aguiar de Souza Monteiro, Milene Miranda Praça Fontes, 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, thalyavitor26@gmail.com; mayla_scotta@hotmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, geisiele.martins@ufes.br, kati Monteiro0603@gmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

Resumo

Paubrasilia echinata, conhecida popularmente como pau-brasil, é uma espécie arbórea nativa do Brasil, endêmica da Mata Atlântica, e, atualmente ameaçada de extinção. Em virtude da baixa taxa de germinação e perda de viabilidade das sementes em poucos dias, técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV) *in vitro* são ferramentas viáveis para propagação e preservação de espécies ameaçadas de extinção. Essas técnicas incluem a germinação, o desenvolvimento de plântulas e a micropropagação. Contudo, *P. echinata* é particularmente suscetível à contaminação por microrganismos endógenos, o que dificulta o cultivo *in vitro*. 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 germinação e estabelecimento inicial de plântulas *in vitro*. A combinação das soluções de NaClO + NPsAg (60%) obteve média de 20% de contaminação no tempo de 30 min, e, 20% de sobrevivência dos explante.

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

Área do Conhecimento: Fisiologia.

Introdução

A espécie arbórea *Paubrasilia echinata* Lam, conhecida popularmente como pau-brasil, é nativa da Mata Atlântica. Durante muito tempo, seu pigmento vermelho chamado brasileína foi utilizado para tingir tecidos de nobres. Além disso, a madeira do pau-brasil foi amplamente empregada na construção naval e na fabricação de móveis. A exploração da espécie foi intensa desde o período do descobrimento até 1835, de acordo com Chu et al. 2003.

Outro agravante é que, as sementes quando mantidas em temperatura ambiente perdem a viabilidade de germinação no período de 3 meses (Barbedo et al., 2002), o que dificulta a propagação da espécie em seu ambiente natural.

Estudos sobre a desinfestação de sementes de pau-brasil são limitados, mas pesquisas existentes indicam a presença de fungos como *Pestalotiopsis sp.*, *Nigrospora sp.*, *Curvularia sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides*, que têm sido associados a baixos índices de germinação e alta mortalidade das sementes (Mendes et al., 2004; Lisbôa et al., 2004).

Neste sentido, abordagens biotecnológicas em condições controladas, como a cultura de tecidos vegetais (CTV) *in vitro*, podem ser soluções práticas eficazes para solucionar esses problemas (Rout et al., 2000), tendo em vista que, esta, possibilita uma rápida multiplicação de um único indivíduo, com alta fidelidade genética, independente de variações climáticas, em tempo e espaço reduzido e com maior controle sobre a sanidade do material propagado. (Erig e Schuch, 2005).

Todavia, o pau-brasil apresenta uma grande limitação no estabelecimento *in vitro* devido a alta porcentagem de contaminação com fungos (Campos; Cota, 2015). Estudos relacionados a desinfestação de explantes e sementes de diferentes espécies arbóreas foram testados, como, exposição a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, fungicidas e até

mesmo o uso de nanopartículas de prata (NPsAg), todavia, com baixa taxa de descontaminação e sobrevivência (Tung et al.2018).

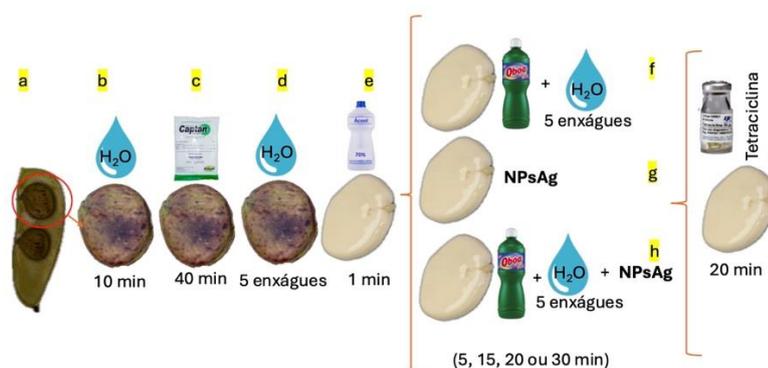
Portanto, estabelecer um protocolo para desinfestação e estabelecimento *in vitro* de mudas de *P. echinata* é indispensável. Em suma, o presente trabalho tem teve objetivo avaliar e investigar os efeitos dos agentes desinfetantes hipoclorito de sódio (NaClO) e nanopartículas de prata (NPsAg) na porcentagem (%) de contaminação e % de sobrevivência de sementes de pau-brasil germinadas *in vitro*.

Metodologia

Bagas de pau-brasil (Fig. 1a) com aproximadamente 10 semanas (Fig. 1d) após a floração (Fig. 1b) foram coletadas de um arboreto localizado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória. As sementes foram utilizadas para os experimentos de germinação e estabelecimento de plântulas *in vitro*. O estudo foi conduzido no Laboratório de Citogenética e de Cultura de Tecidos Vegetais (LABCITO) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus Alegre.

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 (GA₃) (1 g L⁻¹) (Figura 1).

Figura 1. Desinfestação de sementes de pau-brasil coletadas aproximadamente 10 semanas após a floração 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 das sementes.



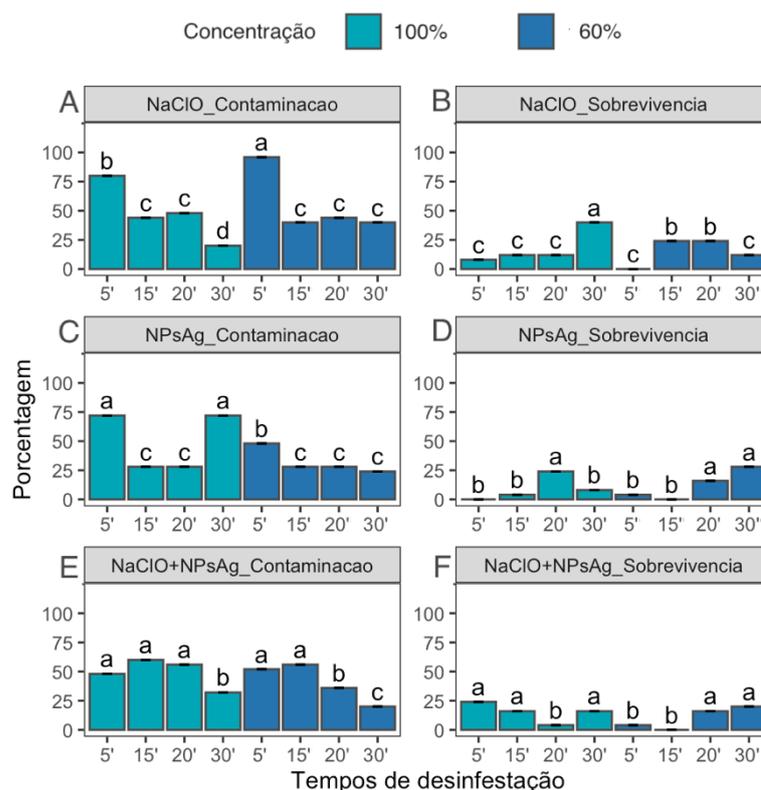
Fonte: O autor.

O experimento foi mantido por 30 dias em sala de crescimento a temperatura de 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) com $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes (20W, Osram®). O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições por tipo de maturação dos frutos. As variáveis avaliadas foram porcentagem (%) de contaminação e % de sobrevivência.

Resultados

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

Figura 2. Resultados de contaminação e sobrevivência das sementes 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 protocolos de desinfestação com as sementes inteiras, utilizando o reagente NaClO, obteve a melhor média no tempo de 30' (100%) com apenas 20% das sementes contaminadas (Fig. 2A), da mesma forma que, para a sobrevivência (Fig. 2B), a melhor média foi alcançada no mesmo tempo de tratamento com 40% de sobrevivência. Já o protocolo de desinfestação com a solução de NPsAg, as médias foram estatisticamente iguais nos tempos de 15' e 20' (100%), e, 15', 20' e 30' (60%) com médias entre 24% e 28% de contaminação (Fig. 2C).

A sobrevivência das sementes utilizando as soluções de NPsAg (Fig.2D) foi estatisticamente igual entre os tempos de 20'(100 e 60%) e no tempo de 30'(60%) com médias de 24%, 16% e 28%, respectivamente. Quando avaliado a desinfestação utilizando a junção dos dois reagentes, NaClO e NPsAg, o melhor tratamento para conter a contaminação foi a exposição das sementes no tempo de 30'(60%) com apenas 20% dos explantes contaminados (Fig. 2E). Já a sobrevivência obteve médias estatisticamente iguais entre os tempos de 5', 15'e 30'(100%) e 20'e 30'(60%) com médias entre 24% e 16% de sobrevivência (Fig. 2F).

Apesar do avanço no protocolo de desinfestação estabelecido, nota-se o crescimento anormal das plântulas após a germinação, conforme demonstrado na Figura 3. Para além, é possível observar uma melhora significativa apenas nas sementes que foram expostas às soluções de NaClO, e demais reagentes desinfetantes.

Figura 3. Plântulas germinadas a partir de sementes 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), GA₃ (1 g L⁻¹) e, ajuste de pH em 5,7 ± 0,1. **Legenda:** plântulas germinadas a partir de sementes contendo os cotilédones expostas às 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.



Fonte: O autor.

Discussão

Os dados mostrados na Figura 2 corroboram a literatura existente, que aponta que a combinação de reagentes químicos, como álcool, hipoclorito, fungicidas e soluções de AgNPs, é efetiva na desinfestação *in vitro* de explantes obtidos diretamente do campo (Ferreira et al., 2009; Butt et al., 2013; Arruda et al., 2019). Sendo esta etapa considerada a mais importante para o início dos protocolos de CTV *in vitro*.

O controle microbiano através de reagentes químicos é fundamental para o sucesso desta técnica. Contudo, a resistência bacteriana endógena a esses compostos (Ramakrishna et al., 2019), representa um desafio significativo para essa prática. Isso destaca a importância de selecionar desinfetantes que minimizem a toxicidade e maximizem a viabilidade das plântulas.

Os efeitos desses reagentes químicos estão intrinsecamente ligados à sua interação com a estrutura celular dos microrganismos. Conforme Rocha (2005) descreve, o hipoclorito de sódio é um oxidante forte, cuja ação pode resultar em modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente (Rocha et al., 2005). O álcool é amplamente utilizado na desinfestação contra microrganismos pois têm a capacidade de desnaturar proteínas e aumentar a permeabilidade da membrana (Pelczar et al., 1996; Silva et al., 2012; Arruda, 2019), além de sua ação surfactante.

As soluções de NPsAg afetam significativamente os processos metabólicos essenciais, causam danos à membrana celular e podem penetrar e dispersar biofilmes bacterianos (Tung et al., 2018; Tung

et al., 2021). Contudo, os possíveis efeitos tóxicos dessas soluções sobre o desenvolvimento morfofisiológico das plantas ainda não são totalmente compreendidos.

Embora a tetraciclina seja um antibiótico de amplo espectro, seu uso na cultura de tecidos é limitado devido à alta fitotoxicidade, que pode resultar em clorose das folhas e outros efeitos devido à interrupção na síntese de proteínas e à inibição da produção de ARNs e ATPs (Everson; Pereira, 2003, Falkiner, 1990).

Para *P. echinata*, que demonstra alta suscetibilidade a patógenos endofíticos, é crucial empregar métodos de desinfestação mais rigorosos e frequentemente usar uma combinação de diferentes reagentes. Portanto, é fundamental ajustar tanto o tempo de exposição quanto as concentrações dos reagentes para estabelecer um protocolo de desinfestação eficaz, que garanta taxas aceitáveis de desinfestação, e, também, plântulas saudáveis para serem usadas na micropropagação *in vitro* dessa espécie.

Conclusão

Os melhores resultados de desinfestação foram obtidos quando as sementes foram expostas à combinação de cloro e nanopartículas. No entanto, a exposição prolongada a esses reagentes levou ao crescimento anormal das plantas, evidenciando a necessidade de ajustes no protocolo adotado.

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, C.J.; BILIA RITA, D.A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Braz. J. Bot.* 25 (4), Dez 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002012000007>

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. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760140243>.

CHU, E.P.; TAVARES, A.R.; PESCADOR, R.; KERBAUY, Gilberto Barbante. Propagação *in vitro* de *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL). Simpósio "Pau-brasil: Ciência e Arte. 2003. "Auditório FAPESP" - São Paulo.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. 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.

EVERSON, J.; PEREIRA, S. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido (1). *Pesq. agropec. bras.*, n. 11, p. 1273–1279, 2003.

FALKINER, F. R. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *International Association for Plant Tissue Culture Newsletter*, Calgary, n. 60, p. 14-21, 1990.

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.

LISBÔA, T.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Sanidade e potencial germinativo de sementes de *Caesalpinia echinata*, Lam (pau-brasil) coletadas no campus da ESALQ/USP, em Piracicaba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa. Palestras e Resumos: João Pessoa, 2004. p.182.

MENDES, S.S.; SANTOS, D.M.; MOURA, A.O.; FRANCO FILHO, E.; MESQUITA, J.B. Qualidade sanitária de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa. Palestras e João Pessoa, 2004. p.193.

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.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books, v. 1, p. 210-224, 1996.

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

ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol. Adv.*, v. 18, p. 91–120, 2000.

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.

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.