

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS DE *Melanoxylon brauna*

Ingridh Medeiros Simões¹, Simone Wellita Simão de Carvalho², Joana Silva Costa¹, Débora Pellanda Fagundes², José Carlos Lopes², Rodrigo Sobreira Alexandre¹

¹Universidade 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, simoes.ingridh@gmail.com, joanasilvacosta9@hotmail.com, rodrigossobreiraalexandre@gmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Agronomia, Alto Universitário, S/Nº, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, simonewellita@gmail.com, debora.pellanda@yahoo.com.br, jcufes@bol.com.br

Resumo

Melanoxylon brauna (braúna), da família Fabaceae, é uma espécie de interesse comercial devido à sua madeira de alta qualidade, mas encontra-se na categoria vulnerável a extinção. A propagação da braúna enfrenta desafios como a baixa viabilidade de sementes e alta mortalidade de plântulas, tornando a cultura de tecidos uma técnica promissora. Objetivou-se com este trabalho analisar diferentes tratamentos de desinfestação no estabelecimento de explantes foliares adultos de *M. brauna*. Folhas de *M. brauna* foram coletadas, lavadas, desinfestadas com diferentes tratamentos de hipoclorito de sódio e fungicida Cercobin®, e seccionadas. Estes explantes foram cultivados em meio WPM e mantidos no escuro a 27 ± 2 °C, com análise de contaminação e oxidação após 15 dias. Os explantes provenientes de folhas de árvores de *M. brauna* submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação apresentaram 100% de contaminação por bactérias e também 100% de oxidação. Portanto, recomenda-se o uso de um antibiótico para conter a contaminação bacteriana.

Palavras-chave: Braúna. Desinfestação. Cultura de tecidos vegetais.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônômica/ Engenharia florestal.

Introdução

A espécie *Melanoxylon brauna* Schott. Pertence a família Fabaceae e é popularmente conhecida como braúna. Devido a sua madeira de alta densidade e qualidade, foi considerada uma espécie de grande interesse comercial no passado, resultando na sua inserção na lista de espécies ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (LIMA *et al.*, 2013; BRASIL, 2022).

A braúna possui obstáculos na obtenção e viabilidade de sementes por ser altamente atrativa aos insetos predadores (SANTOS *et al.*, 1991), além da alta mortalidade de plântulas em viveiros (GIBSON *et al.*, 2019). Diante desses entraves na propagação da braúna, a cultura de tecidos pode ser considerada uma técnica promissora pois permite produzir, num curto espaço de tempo uma grande quantidade de mudas através de um único explante, e essa tem sido cada vez mais utilizada em espécies florestais (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2014).

O primeiro passo para o estabelecimento de uma cultura *in vitro* é a desinfestação do explante. Nessa etapa, o uso de substâncias desinfestantes é essencial, pois atuam eliminando quaisquer microrganismos presentes nos explantes (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005; CARVALHO; NASCIMENTO; BRAGA, 2006). O tipo de agente desinfestante e o tempo de exposição a estes produtos depende muito dos explantes a serem trabalhados.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho analisar diferentes tratamentos de desinfestação no estabelecimento de explantes foliares adultos de *M. brauna*.

Metodologia

A fonte de explante utilizada são discos foliares obtidos da árvore matriz localizada no município de Jerônimo Monteiro, na comunidade Oriente, Espírito Santo (20°42'51''S, 41°21'49''W). As folhas foram coletadas de brotações juvenis com auxílio de podão e transportadas em caixas térmicas para Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, da Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, Espírito Santo.

As folhas foram previamente lavadas com detergente neutro (Ypê®) para retirada da cerosidade, a fim de promover maior penetração dos agentes desinfestantes.

Em câmara de fluxo laminar as folhas foram submersas em álcool 70% por um minuto e posteriormente, desinfestadas de acordo com os tratamentos: T1. NaOCl 0,5%/10' + fungicida Cercobin® 2%/10'; T2. NaOCl 1%/10' + Cercobin® 2%/10'; T3. NaOCl 2%/10' + Cercobin® 2%/10'; T4. NaOCl 0,5%/10' + Cercobin® 4%/10'; T5. NaOCl 1%/10' + Cercobin® 4%/10'; T6. NaOCl 2%/10' + Cercobin® 4%/10'. Sendo que após cada agente desinfestante o material foi enxaguado, por três vezes com água destilada e autoclavada por 30 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

As folhas desinfestadas foram seccionadas na nervura central sob papel autoclavado (temperatura: 121 °C; pressão: 1 atm; tempo: 30 minutos). E os explantes foram dispostos individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM (Woody Plant Medium) Sigma® (2,41 g L⁻¹) (LLOYD; McCOW, 1980), suplementado com 30 g L⁻¹ sacarose (Dinâmica®), 0,1 mg L⁻¹ mio-inositol (Sigma®), 1 g L⁻¹ de PVP (Synth®), ágar Kasvi® (7 g L⁻¹), cujo pH foi ajustado para 5,7±0,1 e em seguida autoclavado por 20 minutos à temperatura de 121 °C e a pressão de 1 atm. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento no escuro sob temperatura de 27 ± 2 °C. E após 15 dias analisou-se a porcentagem de contaminação e oxidação dos explantes.

Resultados

Os explantes provenientes de folhas de árvores de *M. brauna* submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação apresentaram 100% de contaminação por bactérias e também 100% de oxidação (Figura 1).

Figura 1 - Explante foliar de *M. brauna* contaminado por bactéria e oxidado.



Fonte: os autores.

Discussão

O processo de desinfestação é particularmente desafiador, pois demanda a obtenção de tecidos descontaminados sem causar danos ao explante, que possam comprometer sua sobrevivência. Além disso, a descontaminação do material está diretamente relacionada ao tipo e origem do material, bem como a época de coleta, tornando-a mais difícil para materiais provenientes do campo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; DUTRA *et al.*, 2009).

Compostos clorados, a exemplo do hipoclorito de sódio (NaOCl), apresentam amplo espectro de ação, podendo atuar de forma efetiva na desinfestação superficial dos explantes (EMBRAPA, 2008). O cloro, princípio ativo do NaOCl, consegue penetrar na célula do microrganismo através da membrana

citoplasmática, atuando sobre as proteínas e ácidos nucleicos (INGRAM *et al.*, 2003). Porém outro fator que deve ser levado em consideração para uma eficiente descontaminação do tecidos é o tempo de exposição e a concentração dos agentes desinfestantes. De acordo com Pereira *et al.* (2014) o uso de álcool e hipoclorito geralmente são eficientes no controle de contaminação fúngica. E portanto, dependendo do explante a imersão em amoxicilina (antibiótico), é necessária para evitar a contaminação por bactérias que podem estar presentes nos explantes (HANDA; SAMPAIO; QUISEN, 2005).

Outro entrave na desinfestação e estabelecimento dos explantes *in vitro* é a oxidação que pode ser uma reação normal em função da liberação de compostos fenólicos pelo próprio tecido (HANDA; SAMPAIO; QUISEN, 2005; CANÇADO *et al.*, 2009). Outro fator relacionado é a ação dos agentes desinfestantes, que podem causar necrose no explante sem, no entanto, impedir a contaminação. Portanto, nas condições de tempo de exposição e concentração utilizadas, esses agentes não são eficazes no processo de desinfestação.

Conclusão

Os explantes provenientes de folhas de árvores de *M. brauna* contaminaram e oxidaram 100% aos 15 dias, ou seja, o uso de NaOCl e fungicida Cercobin® nas concentrações e tempo de exposição testados, não foram eficientes na descontaminação. Portanto, recomenda-se o uso de um antibiótico para conter a contaminação bacteriana.

Referências

BRASIL. Portaria MMA n.º 148, de 7 de junho de 2022. **Atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial da União. p.74. 8 jun. 2022. Seção 1.

CANÇADO, G. M. A. *et al.* Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p.64-74, 2009.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Rev. Árvore**, v. 31, n. 4, p. 717-730, 2007.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciênc. Agrotec.**, v. 29, n. 6, p. 1281-1287. 2005.

DUTRA, L. F. *et al.* A micropropagação de Eucalipto. **Pesq. Flor. Bras.**, v. 58, p. 49-59, 2009.

EMBRAPA – RIBEIRO, J. M.; CANUTO, K. M.; VESCHI, J. L. A. **Compostos clorados**: Aspectos gerais e sua utilização como agente sanitizantes na agricultura, micropropagação e pecuária. Petrolina – PE/ Embrapa semi-Árido, 2008.

GIBSON, E. L. *et al.* Controlled-release fertilizer on growth of *Melanoxylon brauna* Schott seedlings. **Floram**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2019.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/EmbrapaCNPq, 1998. p.183-260.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amaz.**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.

INGRAM, P. R. *et al.* The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 410, n. 1, p. 121-133, 2003.

LIMA, H. C. *et al.* **Fabaceae/Leguminosae**. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proc. Int. Plant Propag. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1980.

PERREIRA, G. A. *et al.* Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira 'Thap Maeo'. **Rev. Ceres**, v. 61, n.3, p. 299-305, 2014.

SANTOS, G. P. *et al.* Danos causados por *Sennius cupreatus* e *Sennius spodiogaster* (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de *Melanoxylon brauna*. **Rev. Ceres**, v. 38, n. 218, p. 315-322, 1991.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: UFV, 2007. 279 p.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG), através do projeto "Consolidação dos Programas de Pós-Graduação da área de Ciências Agrárias do Estado do Espírito Santo - Ciências Florestais" pelo apoio financeiro da pesquisa, por meio do Edital FAPES/CNPq N° 23/2018 – PRONEM (Termo de Outorga 131/2021 e Processo N° 2021-FDGS5); Edital FAPES n° 12/2021 - Programa de Capacitação de Recursos Humanos na Pós-Graduação - Doutorado (PROCAP 2022 – doutorado). 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.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, por disponibilizar a estrutura e equipamentos utilizados nesse trabalho.