

DESINFESTAÇÃO E INDUÇÃO DE CALOS *IN VITRO* DE *PAUBRASILIA ECHINATA*

Mayla Bessa Scotá, Aline dos Santos Bergamin, Loren Cristina Vasconcelos, Thalya Campelo Vitor, Gustavo Fernandes Mariano, Milene Miranda Praça Fontes, Elias Terra Werner¹.

Universidade 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, alinebergamin258@hotmail.com, loren-vasconcelos@hotmail.com, thalyavitor26@gmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

Resumo

O pau-brasil (*Paubrasilia echinata*), uma espécie ameaçada de extinção da Mata Atlântica, enfrenta desafios significativos para sua conservação devido à recalcitrância de suas sementes. A cultura de tecidos vegetais (CTV) surge como uma solução promissora para a propagação da espécie, superando a dificuldade de regeneração natural. Este estudo focou na desinfestação eficiente de explantes provenientes de sementes imaturas e na indução de calogênese *in vitro* utilizando diferentes concentrações do regulador de crescimento vegetal Dicamba (DIC). As bagas foram tratadas com desinfetantes e as sementes, inoculadas em meios de cultura MS com ou sem Dicamba (100 e 200 μM), foram subcultivadas periodicamente. A desinfestação foi bem-sucedida, mantendo contaminação abaixo de 7%. A indução de calos foi significativamente melhor nos meios contendo DIC, com a concentração de 200 μM resultando na maior taxa de indução de calos, de 90% após 30 dias.

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

Área do Conhecimento: Fisiologia.

Introdução

O pau-brasil (*Paubrasilia echinata*), uma espécie emblemática da Mata Atlântica e nativa do Brasil, está ameaçado de extinção devido à perda de habitat e exploração excessiva (Lucn, 2023). Reconhecido como símbolo nacional, o pau-brasil possui importância ecológica e cultural significativa. No entanto, a sua conservação enfrenta desafios notáveis, especialmente relacionados à propagação natural, uma vez que suas sementes são recalcitrantes (Lisboa et al., 2004), ou seja, não suportam bem a desidratação e têm baixa viabilidade quando armazenadas por longos períodos. Esta característica dificulta a regeneração natural da espécie e a manutenção de sua diversidade genética (Barbedo et al., 2002).

A cultura de tecidos vegetais (CTV) surge como uma abordagem promissora para a conservação e propagação do pau-brasil, oferecendo soluções para superar as barreiras impostas pela recalcitrância das sementes (Rout et al., 2000; Werner et al., 2009; Wen et al., 2020). Técnicas como germinação *in vitro*, calogênese e indução de embriões somáticos são fundamentais nesse contexto, porém, sua aplicação é desafiada pela alta taxa de contaminação por microorganismos endógenos presentes nos explantes coletados no campo (Campos; Cota, 2015). O desenvolvimento de protocolos específicos de CTV é essencial para cada espécie, pois garante a adaptação das técnicas às necessidades particulares dos explantes e ao ambiente de cultivo. Estes protocolos incluem a definição de condições ideais de desinfestação (Ferreira et al., 2009; Butt et al., 2013; Arruda et al., 2019), meios de cultura, e reguladores de crescimento vegetal (RCVs) para induzir a calogênese e a formação de embriões somáticos.

O uso de RCVs é essencial para o sucesso dessas etapas, pois eles promovem a resposta desejada dos explantes às condições *in vitro* (Grattapaglia; Machado, 1998). Comumente utilizados em protocolos de CTV, os RCVs incluem auxinas, como o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolacético (AIA), além do próprio Dicamba (DIC), que é conhecido por sua eficácia em diferentes concentrações para promover o desenvolvimento dos tecidos (Grattapaglia; Machado, 1998). A escolha e a concentração adequadas desses reguladores são determinantes para superar os desafios relacionados à indução de calogênese e formação de embriões somáticos.

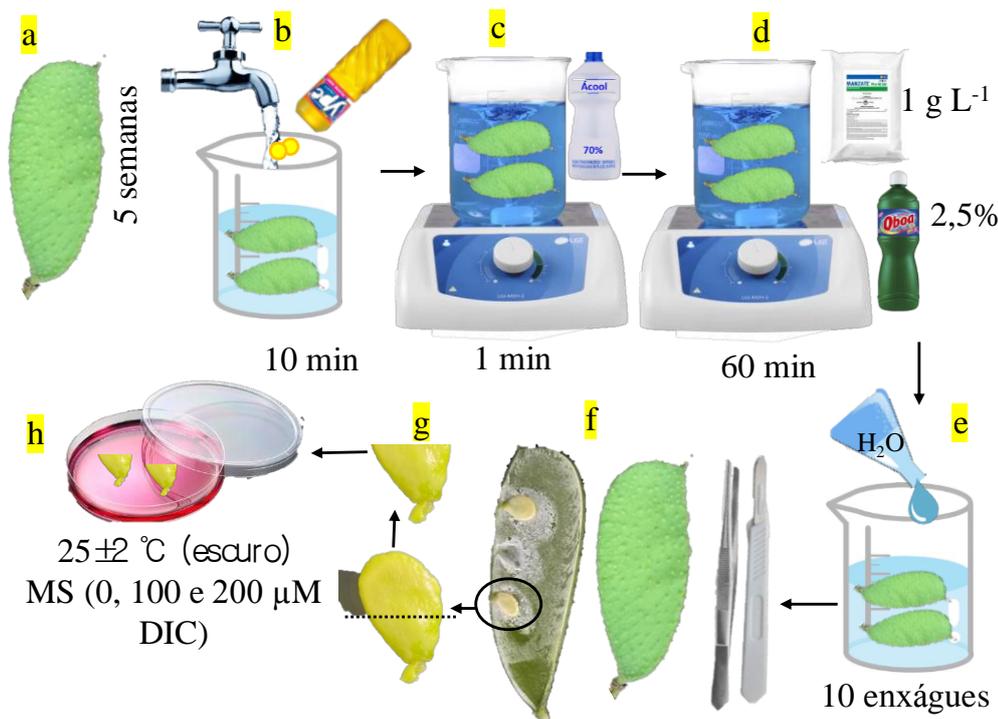
Este estudo visa abordar os desafios específicos enfrentados na propagação do pau-brasil ao focar na desinfestação eficiente de explantes originados de sementes imaturas, coletadas cinco semanas após a floração, e testar a eficácia do RCV DIC em diferentes concentrações para induzir a calogênese *in vitro*. Além disso, busca-se induzir embriões somáticos como etapa final, visando a conservação e propagação da espécie pau-brasil.

Metodologia

Bagas de pau-brasil com 5 semanas após a floração foram coletadas de um arboreto localizado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória. As sementes foram utilizadas para o experimento de indução de calos e embriões somáticos *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 5 (Fig. 1a) semanas foram lavadas em água e detergente neutro (Fig. 1b), imersas em álcool 70% (v/v) (Fig. 1c) por 1 minuto, em seguida, imersas em Hipoclorito de Sódio (NaClO) (2 a 2,5%) + Fungicida Manzate® (1 g L⁻¹) por 60 min (Fig. 1d), e, ao final, enxaguadas 10 vezes com água autoclavada (Fig. 1e). As bagas foram abertas (Fig. 1f), e, as sementes seccionadas ao meio (Fig. 1g). As partes contendo os embriões (Fig. 1h) foram inoculadas em 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. Os meios testados foram MS, MS suplementado com 100 µM DIC e 200 µM DIC (Figura 1). Após 15 dias nessas condições de incubação, os explantes foram subcultivados para novos meios sem a adição de RCV, e assim, a cada 30 dias até que completassem 60 dias.

Figura 1. Desinfestação de sementes de pau-brasil coletadas 5 semanas após a floração para inoculação *in vitro*, indução de calos e embriões somáticos. Legenda: (a) bagas; (b) enxágue em água; (c) imersão em álcool 70% (v/v); (d) imersão em NaClO (2 a 2,5%) + Fungicida Manzate (1 g L⁻¹); enxágue com água autoclavada; (e); abertura das bagas (f); secção longitudinal das sementes (g) e inoculação da parte contendo o embrião zigótico em meio MS (h).



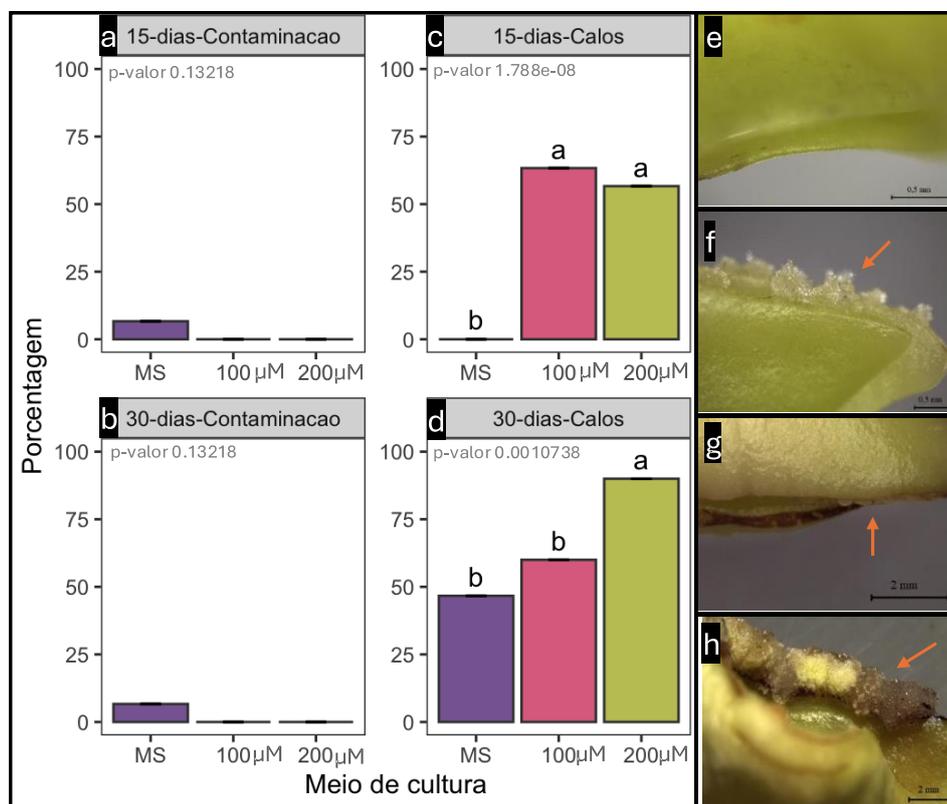
Fonte: O autor.

O experimento foi mantido por 30 dias em sala de crescimento a temperatura de 25 ± 2 °C sob escuro constante. O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições por tratamento, cada repetição composta por 2 explantes por placa. As variáveis avaliadas foram porcentagem (%) de contaminação (%Co), % de calos (%Ca) com 15 e 30 dias de incubação.

Resultados

A variável de indução de calos (15 e 30 dias) em sementes de pau-brasil coletadas 5 semanas após a floração, apresentaram *p*-valor significativo ($< 0,05$), indicando que os resultados são estatisticamente relevantes. No entanto, na variável de contaminação não foi significativo (Figura 2).

Figura 2. Porcentagem de contaminação (a e b) e indução de calos (c e d) em explantes de sementes de pau-brasil inoculadas em meio MS, MS + 100 μ M DIC e MS + 200 μ M DIC. Explante com 15 (e) e 30 dias (f) em meio MS. Explantes com 15 (g) e 30 dias (h) em meio MS + 200 μ M DIC. Setas indicam o surgimento de calos (f,g,h). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: O autor.

Os resultados estatísticos obtidos durante o estudo mostram dados relevantes sobre a eficácia dos tratamentos aplicados aos explantes. A desinfestação dos explantes foi efetiva, mantendo taxas de contaminação abaixo de 7% tanto aos 15 dias (Fig. 2a) quanto aos 30 dias (Fig. 2b) de incubação, independentemente do meio de cultivo testado. Estes dados indicam um sucesso significativo nas etapas iniciais de preparação dos explantes para a cultura *in vitro*.

Em relação à indução de calos, os resultados mostram diferenças notáveis entre os meios com e sem adição do RCV. Aos 15 dias (Fig. 2c), os meios contendo Dicamba nas concentrações de 100 μ M (56,33) e 200 μ M (63,66) apresentaram médias estatisticamente semelhantes na indução de calos,

enquanto o meio sem adição do regulador não apresentou crescimento de calos. Esse resultado sugere que a presença de Dicamba é crucial para o desenvolvimento de calos.

Após 30 dias (Fig. 2d), observou-se que o meio com 200 μM de Dicamba proporcionou a melhor média de crescimento de calos, com uma taxa de indução de calos de 90%. Esse resultado demonstra a eficácia do Dicamba na concentração mais alta, destacando-o como a melhor opção para a indução de calos nos explantes ao longo do período avaliado.

Discussão

Os resultados obtidos no estudo destacam a importância dos reagentes utilizados na desinfestação dos explantes e o papel crucial do RCV DIC na indução de calos.

A desinfestação eficiente dos explantes é um passo crítico na cultura de tecidos vegetais, especialmente para espécies como o pau-brasil, que apresentam alta taxa de contaminação por microorganismos. 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). A adição do fungicida Manzate™ complementa essa ação ao oferecer proteção adicional contra fungos que podem não ser totalmente erradicados pelos outros agentes. O enxágue final com água autoclavada garante a remoção completa dos reagentes químicos, prevenindo toxicidade aos explantes e possíveis efeitos adversos sobre o crescimento subsequente.

No que diz respeito ao uso do Dicamba, um regulador de crescimento vegetal classificado como auxina, seus efeitos na indução de calos são notáveis (De Vasconcelos et al., 2018; Rossato et al., 2019). Auxinas (Taiz et al., 2013) como o Dicamba são fundamentais para a regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, pois promovem a divisão celular e a formação de tecidos meristemáticos (De Vasconcelos et al., 2018; Rossato et al., 2019). O Dicamba atua ao imitar o efeito das auxinas naturais, estimulando as células dos explantes a formar calos, ao promover a diferenciação e proliferação celular (Werner et al., 2010; Feher et al., 2003). Aos 15 dias de incubação, as concentrações de 100 μM e 200 μM de Dicamba foram eficazes na indução inicial de calos, mas a concentração de 200 μM se destacou após 30 dias, indicando que níveis mais elevados de Dicamba favorecem uma maior taxa de indução e desenvolvimento de calos. A concentração elevada provavelmente proporciona um ambiente hormonal mais favorável, resultando em uma maior resposta de calogênese.

A indução de calos é uma etapa crucial no processo de cultura *in vitro*, servindo como um ponto de partida essencial para a embriogênese somática (Werner et al., 2010). O desenvolvimento bem-sucedido de calos permite a continuidade do processo, possibilitando etapas subsequentes como a formação de embriões somáticos e a regeneração de plantas completas. Assim, a aplicação eficaz do Dicamba e a desinfestação rigorosa dos explantes estabelecem uma base sólida para o avanço nas técnicas de cultivo *in vitro* de pau-brasil.

Conclusão

Os resultados demonstram que a desinfestação dos explantes foi bem-sucedida, com taxas de contaminação abaixo de 7%. A indução de calos foi significativamente favorecida pela adição de Dicamba, com as melhores taxas de indução observadas na concentração de 200 μM após 30 dias. Assim, o Dicamba se revela um regulador de crescimento vegetal eficaz para a indução de calos no cultivo *in vitro* do pau-brasil.

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>

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

DE VASCONCELOS, MARIA JOSÉ VILAÇA et al. Callus induction and plant regeneration from immature embryos culture of tropical maize. 2018.

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.

FEHER, Attila; PASTERNAK, Taras P.; DUDITS, Denes. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.

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.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.183-260.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/33974/9818224>>. Acesso em: 16 de ago. de 2024.

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.

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.

ROSSATO, Marieli et al. Embryogenic potential of the callus of gabirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, p. 46358, 2019.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Tradução de Armando Molina Divan JUNIOR et al. 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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

WERNER, Elias Terra et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 1046-1051, 2010.

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.