

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

DANIELE ZULIN

**AVALIAÇÃO DOS AGENTES DESINFESTANTES NA
ESTERILIZAÇÃO SUPERFICIAL DE EXPLANTES CAULINARES
PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE GUAVIRA**

Dourados – MS

2013

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

DANIELE ZULIN

**AVALIAÇÃO DOS AGENTES DESINFESTANTES NA
ESTERILIZAÇÃO SUPERFICIAL DE EXPLANTES CAULINARES
PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE GUAVIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani.

Dourados – MS

2013

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

DANIELE ZULIN

**AVALIAÇÃO DOS AGENTES DESINFESTANTES NA
ESTERILIZAÇÃO SUPERFICIAL DE EXPLANTES CAULINARES
PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE GUAVIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

Prof^a.Dr^a.Liliam Silvia Candido

Prof^a.Msc. Fernanda Pinto

Apresentado em: __ / __ / __

CONCEITO: _____

DOURADOS– MS
2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder luz e discernimento para não desanimar nos momentos de dificuldades durante minha graduação.

Aos meus queridos pais, Hélio e Genoveva pelo amor e total apoio.

A minha irmã Juliane e todos os meus familiares pelo incentivo e carinho.

Aos meus grandes amigos que me apoiaram durante toda a graduação, em especial,

Douglas, Paula, Renata e Lucas.

Aos colegas de trabalho, principalmente, Cristiane e Thalita pela amizade e por contribuírem para a realização deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, pela ajuda e disponibilidade.

A minha querida orientadora Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Roberta Damiani pela confiança e orientação na execução e conclusão deste trabalho.

A Prof^ªDr^ª Lilian Silvia Candido e aProf^ª. Msc. Fernanda Pinto por aceitarem participarem da banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

E a todos de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E METODOS	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. CONCLUSÕES.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ANEXOS.....	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.A)** Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, **B)** Porcentagem de oxidação dos explantes, e, **C)** Porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) tratados com diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (HgCl₂), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.....15
- Figura 2.** Porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana e oxidação dos explantes no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. Médias seguidas de letras iguais dentro de cada variável analisada não diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).....17
- Figura 3.** Porcentagem de contaminação fúngica no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.....19
- Figura 4.** Porcentagem de contaminação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.....20
- Figura 5.** Porcentagem de oxidação dos explantes no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.....21
- Figura 6.** Porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.....22

LISTA DE ANEXOS

- Figura 7:** Explantes de guavira (*Campomanesiaadamantium*) tratados com cloreto de mercúrio, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.....29
- Figura 8:** Explantes de guavira (*Campomanesiaadamantium*) tratados com peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*.UFGD, Dourados, MS, 2013.....29

RESUMO

Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg (guavira) é uma espécie nativa do Cerrado, com potencial para a exploração sustentável, devido à qualidade nutricional e a diversidade nas formas de exploração dos frutos e propriedades medicinais da planta. Naturalmente a guavira é propagada por sementes, porém com limitações, atribuídas principalmente à recalcitrância e a perda de viabilidade germinativa. Devido à dificuldade de propagação sexuada e inexistência de informações sobre a cultura, o desenvolvimento de uma técnica avançada de propagação assexuada da cultura, fornecerá uma via alternativa para a obtenção de mudas da espécie, superando as limitações do processo germinativo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para assepsia e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de guavira. Para a desinfestação dos explantes foram realizados três experimentos distintos. *Experimento 1:* Efeito do agente químico cloreto de mercúrio nas seguintes concentrações: 0,0 (controle - hipoclorito de sódio a 2,5%); 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 %. *Experimento 2:* Agente cloreto de benzalcônio nas concentrações 0,0 (controle - hipoclorito de sódio a 2,5%); 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 %. *Experimento 3:* Efeito do agente peróxido de hidrogênio adicionado ao hipoclorito de sódio nas concentrações: 0,0 (controle - hipoclorito de sódio a 2,5%); 10; 20; 30 e 40%. A esterilização superficial dos explantes de guavira com 0,025% de cloreto de mercúrio reduziu a contaminação bacteriana de 65,6% para 18,8% e a oxidação dos explantes, de 53,1% para 12,5% quando comparado aos explantes tratados com hipoclorito de sódio (controle). As concentrações de cloreto de mercúrio testadas neste experimento não foram eficientes para controlar a contaminação fúngica. O maior número de explantes estabelecidos (9,4%) foi obtido no tratamento com 0,1% de cloreto de mercúrio. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre as concentrações de cloreto de benzalcônio e o nível de contaminações, é notável uma diminuição de explantes contaminados por bactérias em relação ao controle. A adição de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 30 e/ou 40% ao hipoclorito de sódio a 2,5% foi eficiente na desinfestação dos explantes de guavira, controlando os níveis de contaminação fúngica e oxidação, permitindo a obtenção de maior número de explantes estabelecidos *in vitro*.

Palavras chave: *Campomanesia adamantium*, micropropagação, cultura de tecidos.

ABSTRACT

Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg (guavira) is a native species of Cerrado, with potential for sustainable exploration due to the nutritional quality and diversity in the forms of exploitation of fruits and medicinal plant properties. Naturally guavira is propagated by seeds, but with limitations, attributed mainly to the recalcitrance and loss of germination viability. Due to the difficulty of sexual propagation and lack of information about the culture, the development of an advanced technique of vegetative propagation of culture, provide an alternative route to obtain seedlings of the species, overcoming the limitations of the germination process. Therefore, this study aimed to establish a protocol for sterilization and *in vitro* establishment of shoot explants of guavira. Experiment 1: Effect of the Agent mercuric chloride at the following concentrations: 0.0 (control - sodium hypochlorite at 2.5%), 0.025, 0.050, 0.075 and 0.100%. Experiment 2: Agent benzalkonium chloride concentrations 0.0 (control - sodium hypochlorite 2.5%), 0.025, 0.050, 0.075 and 0.100%. Experiment 3: Effect of hydrogen peroxide added to sodium hypochlorite at concentrations of 0.0 (control - sodium hypochlorite at 2.5%), 10, 20, 30 and 40%. The surface sterilization of Guavira's explants with 0.025% mercuric chloride reduced the bacterial contamination of 65.6% to 18.8% and oxidation of the explants, from 53.1% to 12.5% compared to the explants treated with hypochlorite sodium (control). The concentrations of mercury chloride tested in this experiment were not effective in controlling fungal contamination. The largest number of established explants (9.4%) was obtained in the treatment with 0.1% mercuric chloride. Although no statistical significance between the concentrations of benzalkonium chloride and the level of contamination, it is remarkable a decrease of explants contaminated by bacteria compared to control. The addition of hydrogen peroxide in concentrations of 30 and / or 40% when sodium hypochlorite 2.5% was effective in disinfecting the Guavira's explants, controlling the levels of fungal contamination and oxidation, allowing to obtain a larger number of established explants *in vitro*.

Key-Words: *Campomanesia adamantium*, micropropagation, tissue culture.

INTRODUÇÃO

A guavira ou gabioba (*Campomanesiaadamantium*(Cambess.)O. Berg) pertencente à família Myrtaceae, é uma das diversas frutas nativas do Cerrado, que apresenta potencial de exploração sustentável a curto prazo (VIEIRA et al., 2010). Esta espécie apresenta frutos suculentos, ácidos e levemente adocicados, que podem ser consumidos *in natura*, na forma de sucos, doces, sorvetes e como matéria-prima para licores (PORTO e GULIAS, 2006). A análise da composição química da guavira revela também sua possível utilização como flavorizante na indústria de bebidas, uma vez que, seus frutos apresentam elevada acidez, alto teor de ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos (α -pineno, limoneno e β - (z) ocimeno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem o aroma cítrico (VALLILO et al., 2006). A guavira é também considerada uma planta medicinal, possuindo propriedades antidiarréicas, sendo suas cascas e folhas usadas sob a forma de chás (PARTELLI et al., 2010).

Considerando as diversas formas de utilização da guavira, a qualidade nutricional dos frutos, e até o presente momento, não ter nenhum registro do cultivo dessa espécie, sendo encontrada apenas como nativa (SCALON et al., 2009), é importante e necessário o desenvolvimento de trabalhos que envolvam a coleta de germoplasma, visando à conservação da espécie e a seleção de populações mais resistentes a pragas e doenças, ao transporte e armazenamento, além do desenvolvimento de técnicas mais eficientes de propagação assexuada e de padrões de qualidade para o processamento pós-colheita (PORTO e GULIAS, 2006).

Com relação à propagação da espécie, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas e apesar da guavira ter aparente facilidade de propagação natural, um fator limitante encontrado na propagação da espécie encontra-se na perda do poder germinativo das sementes, necessitando ser semeadas logo após a sua extração dos frutos, conforme verificado por Carmona et al. (1994), Melchior et al. (2006), Scalon et al. (2009). O comportamento das sementes de guavira indica que a espécie pode ser classificada como recalcitrante, por não suportar armazenamento à baixa temperatura e ser intolerante à dessecação (MELCHIOR et al., 2006).

Uma alternativa para a propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado também com as espécies nativas, encontra-se no cultivo *in vitro*, através da micropropagação (SOUZA et al., 2007). Em comparação às técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais, a

possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI e SCHUCH, 2008), como por exemplo, algumas espécies nativas do Cerrado (ANDRADE, 2002).

Mediante a dificuldade de obtenção de mudas de guavira através de sementes, este trabalho teve como objetivo principal a determinação de um protocolo de esterilização superficial dos explantes para o estabelecimento *in vitro* visando à produção de mudas de guavira através da micropropagação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Botânica e Multiuso, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados – MS, no período de agosto de 2012 a junho de 2013.

O material vegetal utilizado foi obtido de ramos vegetativos jovens de guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, coletados de plantas cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da UFGD. No laboratório, realizou-se a retirada das folhas dos ramos coletados. Para todos os experimentos, o preparo dos explantes consistiu na secção dos ramos vegetativos em segmentos nodais com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, contendo duas gemas laterais, e, inoculados em tubos de ensaio contendo 7,0 mL de meio de cultura.

Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na desinfestação dos explantes

Neste experimento os tratamentos consistiram da esterilização superficial dos ramos em solução de cloreto de mercúrio (HgCl_2) nas seguintes concentrações: 0,0 (controle - hipoclorito de sódio a 2,5%); 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 %. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de quatro repetições e cada repetição constituída de oito tubos de ensaio com um explante cada.

Os procedimentos de assepsia e inoculação foram realizados em câmara de fluxo laminar. Para cada 500 mL de solução foi adicionado uma gota de Tween 80. Os ramos foram imersos em seus respectivos tratamentos e mantidos em agitação por 15 minutos e posteriormente lavados com água estéril por três vezes para a retirada dos resíduos. Após o processo de esterilização superficial, prepararam-se os explantes, mantendo duas

gemas laterais, seguido da inoculação em meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o WPM (Wood PlantMedium, LLOYD e MCCOWN, 1980), acrescido de 5,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. A esterilização do meio de cultura foi feita por autoclavagem a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos com os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C e submetidos a um período de escuro por 7 dias. Após este período foram mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 28 e 56 dias após a inoculação, sendo computadas ao final (última avaliação). As características analisadas foram porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, porcentagem de explantes oxidados, e, porcentagem de explantes estabelecidos, sendo considerados estabelecidos aqueles que emitiram brotações. Durante as avaliações, os explantes totalmente oxidados e/ou contaminados foram descartados.

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de X/100, onde X foi o valor obtido, e, submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan (P<0,05) e por regressão polinomial, através do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio na desinfestação dos explantes.

Nesse experimento os tratamentos consistiram na esterilização superficial dos ramos vegetativos por imersão em solução de cloreto de benzalcônio nas seguintes concentrações: 0,0 (controle - hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo); 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100%, totalizando 5 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de quatro repetições e cada repetição constituída de oito tubos de ensaio com um explante cada.

Os procedimentos de assepsia e inoculação foram realizados em câmara de fluxo laminar. Durante os procedimentos de esterilização superficial, os ramos vegetativos foram imersos nos respectivos tratamentos, adicionados de uma gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução e mantidos em agitação por 15 minutos. Ao final dos tratamentos, os ramos foram lavados com água estéril por três vezes, seguido da

preparação dos explantes e inoculação no meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o WPM (Wood PlantMedium, LLOYD e MCCOWN, 1980), acrescido de 5,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. A esterilização do meio de cultura foi feita por autoclavagem a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos com os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C e submetidos a um período de escuro por 7 dias. Após este período foram mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 28 e 56 dias após a inoculação, sendo computadas ao final (última avaliação). As características analisadas foram porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, porcentagem de explantes oxidados, e, porcentagem de explantes estabelecidos, sendo considerados estabelecidos aqueles que emitiram brotações. Durante as avaliações, os explantes totalmente oxidados e/ou contaminados foram descartados.

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de X/100, onde X foi o valor obtido, e, submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan (P<0,05) e por regressão polinomial, através do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio adicionado ao hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes.

Nesse experimento os tratamentos consistiram na esterilização superficial dos ramos vegetativos por imersão em solução de cloreto de peróxido de hidrogênio (PH) adicionado ao hipoclorito de sódio (HS) a 2,5% de cloro ativo, nas seguintes concentrações: 0,0 (controle - hipoclorito de sódio a 2,5%); 10; 20; 30 e 40%, totalizando 5 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de quatro repetições e cada repetição constituída de oito tubos de ensaio com um explante cada.

Os ramos vegetativos foram inicialmente lavados em água corrente e as folhas retiradas sob a coluna d'água. Após a retirada das folhas, os ramos vegetativos foram levados para câmara de fluxo laminar e realizado os tratamentos. Durante os procedimentos de esterilização superficial, os ramos vegetativos foram imersos em

álcool 70% por 30 segundos, seguido da imersão nos respectivos tratamentos, adicionados de uma gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução e mantidos em agitação por 5 minutos. Ao final dos tratamentos, os ramos foram lavados com água estéril por três vezes, seguido da preparação dos explantes e inoculação no meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 6 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. A esterilização do meio de cultura foi feita por autoclavagem a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos com os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidos a um período de escuro por 7 dias. Após este período foram mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 28 e 56 dias após a inoculação, sendo computadas ao final (última avaliação). As características analisadas foram porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, porcentagem de explantes oxidados, e, porcentagem de explantes estabelecidos, sendo considerados estabelecidos aqueles que emitiram brotações. Durante as avaliações, os explantes totalmente oxidados e/ou contaminados foram descartados.

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $X/100$, onde X foi o valor obtido, e, submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) e por regressão polinomial, através do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na desinfestação dos explantes

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, o tratamento dos explantes com cloreto de mercúrio em diferentes concentrações teve efeito significativo apenas para contaminação bacteriana (Figura 1A), para contaminação fúngica (73,1%) 15 (Figura 1A), oxidação (32,5%) (Figura 1B) e estabelecimento *in vitro* (5,6%) (Figura 1C), os tratamentos não tiveram significância estatística.

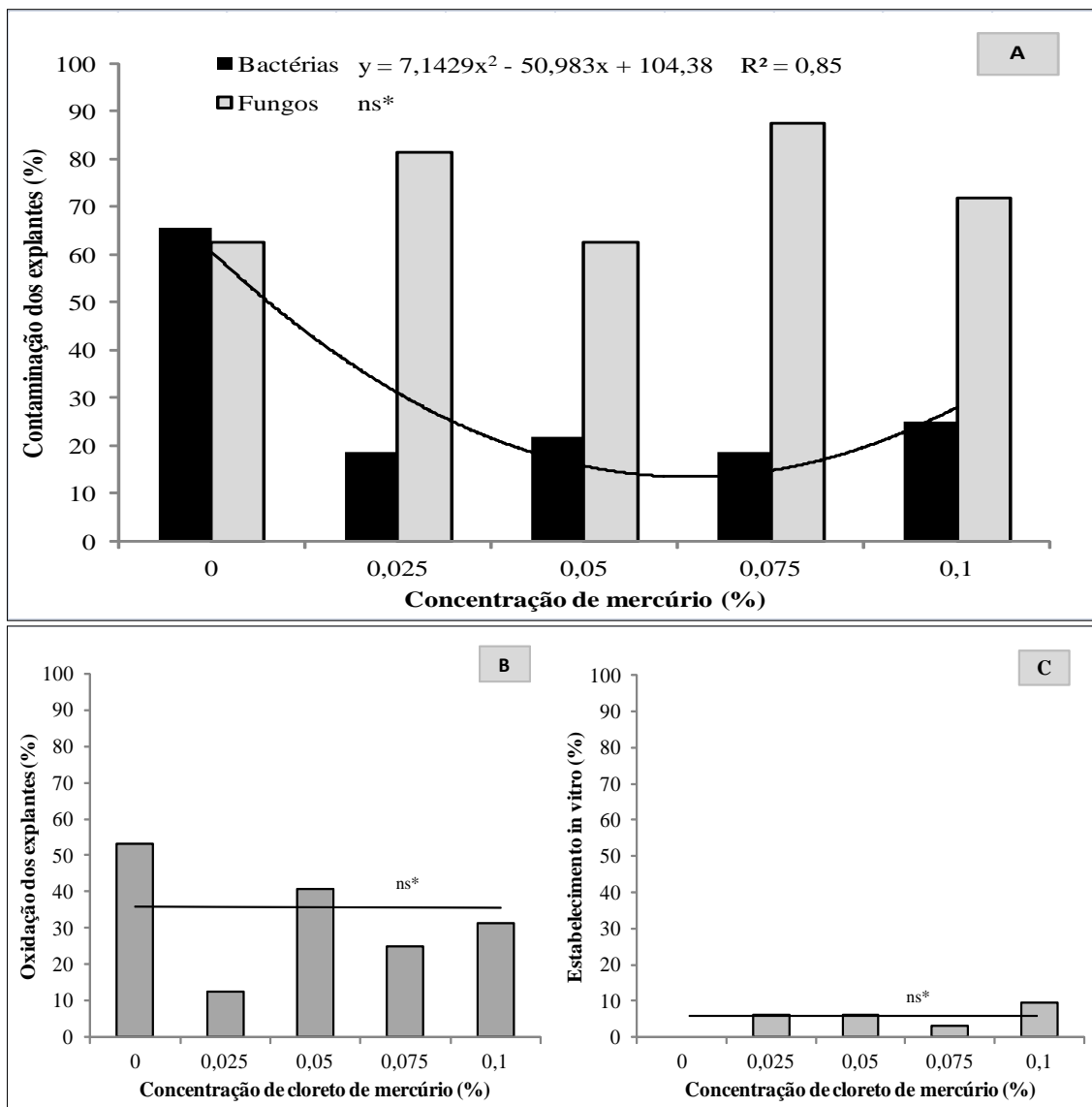


Figura 1. A) Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, B) Porcentagem de oxidação dos explantes, e, C) Porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) tratados com diferentes concentrações de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.

Entretanto a redução da contaminação bacteriana não foi suficiente para garantir o estabelecimento dos explantes. O alto índice de contaminação fúngica, foi a principal causa de perdas de explantes e por isso o baixo índice de estabelecimento *in vitro*, demonstra que o tratamento com cloreto de mercúrio não foi eficiente para controlar esses contaminantes.

A ineficiência do tratamento no controle da contaminação fúngica pode estar relacionada ao fato do material vegetal utilizado ser oriundo de plantas mantidas no campo. A presença de microrganismos endofíticos é muito comum em plantas no seu ambiente natural. Geralmente esses microrganismos não causam danos aparentes nas

plantas (MOMESSO, 2008), porém em condições *in vitro* eles passam a competir com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura impedindo seu desenvolvimento e por excretarem substâncias tóxicas que acabam matando os explantes (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). Esses microrganismos podem escapar do processo de esterilização superficial, principalmente pela permanência em biofilmes, formados pela água depositada sobre os tecidos (CASSELS e DOYLE, 2006). Para garantir a eficiência da esterilização superficial é necessário aumentar a concentração do agente desinfestante utilizado ou prolongar o tempo de exposição dos explantes ao desinfestante.

Quando se utiliza material vegetativo diretamente do campo, os tratamentos desinfestantes devem ser mais criteriosos, em virtude de os explantes apresentarem maiores níveis de contaminação (SOUZA e JUNGHANS, 2006). A manutenção da planta matriz em ambiente mais limpo, como uma casa de vegetação, é uma forma de reduzir ao máximo os estresses e a contaminação quando do estabelecimento *in vitro*, além de permitir a brotação mais intensa e, conseqüentemente, o aumento do rendimento de explantes por planta matriz (PASQUAL et al., 2010).

Em explantes de teca (*Tectonagrandis*L.f.), coletados de plantas matrizes oriundas do campo, tratados por 15 minutos com cloreto de mercúrio a 0,1%, Fermino Júnior et al. (2009) obtiveram redução nas contaminações fúngica e bacteriana próximos a 25%, porém a porcentagem de explantes sobreviventes foi de apenas 10%. Os mesmos autores relatam que para a propagação *in vitro* utilizando material vegetativo coletado diretamente do campo, as porcentagens de contaminações são elevadas e a sobrevivência reduzida.

Ribas et al. (2005) durante a micropropagação de peroba-rosa (*Aspidospermapolyneuron*), testaram dois tipos de desinfestantes, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio e verificaram que o tratamento dos explantes pré-estabelecimento com cloreto de mercúrio a 0,1% durante 10 minutos foi mais eficiente, possibilitando uma taxa de sobrevivência dos explantes mais elevada (84,1%). Os autores utilizaram material vegetativo coletado de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, onde foram realizadas pulverizações periódicas com fungicida benlate.

Durante a micropropagação de *Ocimum gratissimum*L. (Lamiaceae), Saha et al. (2012) utilizou explantes de segmentos nodais, coletados de plantas oriundas do campo e no processo de assepsia dos explantes os autores avaliaram o tempo de exposição dos explantes (1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos) ao agente desinfestante cloreto de mercúrio a 0,1% e constataram que os explantes expostos ao cloreto de mercúrio a 0,1% de 4 a 6

minutos não apresentaram contaminação após 15 dias de cultivo e desenvolveram brotações normalmente.

O cloreto de mercúrio é um agente desinfestante eficiente no combate aos microrganismos contaminantes da cultura de tecidos de plantas e tem sido relativamente usado no processo de esterilização superficial de explantes, porém pode ser tóxico para os tecidos das plantas de espécies e genótipos sensíveis (GEORGE, 1993; SEDLÁK e PAPRŠTEIN, 2007).

Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio na desinfestação dos explantes

Foi observado, elevados percentuais de contaminação por fungos e oxidação dos explantes, resultando na morte dos explantes e como consequência não foi possível obter avaliar o estabelecimento *in vitro*. Em todas as variáveis analisadas, a comparação das médias dos resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas (Figura 2).

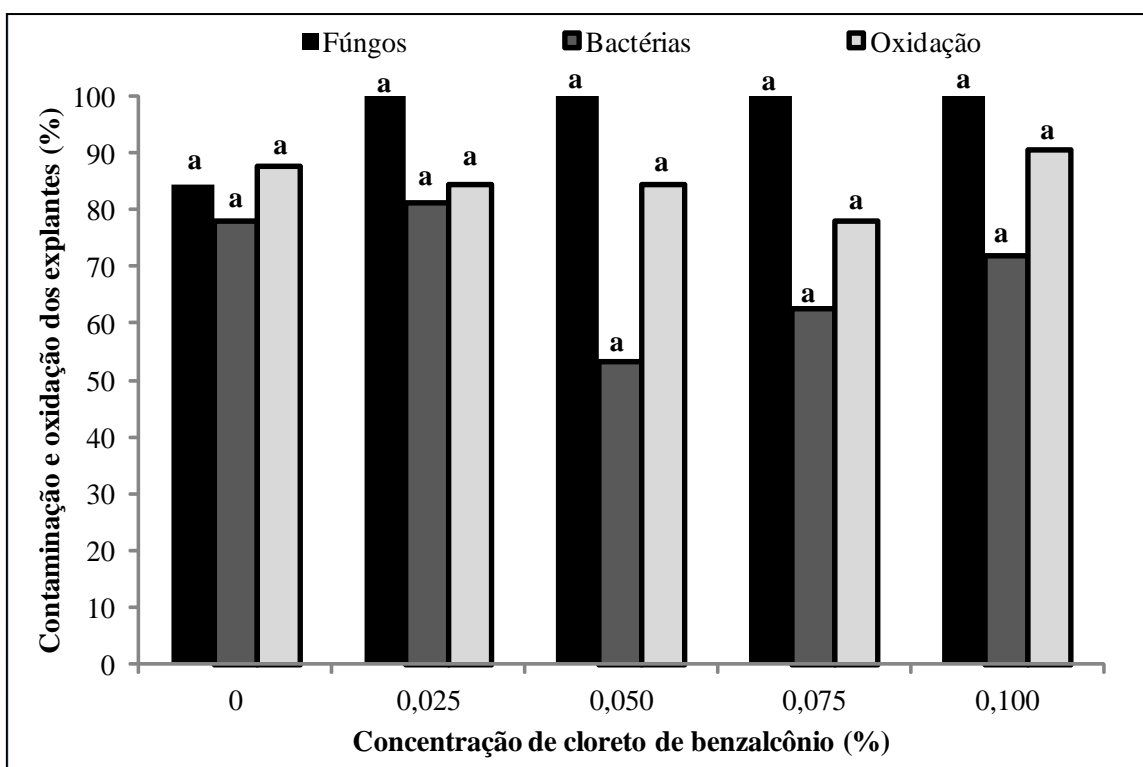


Figura 2. Porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana e oxidação dos explantes no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de cloreto de benzalcônio, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. Médias seguidas de letras iguais dentro de cada variável analisada não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

De acordo com Scherwinski-Pereira (2010) o nulo ou baixo percentual de estabelecimento está relacionado à presença de micro-organismos que, em geral, competem com os explantes, em espaço, carboidratos, nutrientes e outros compostos, podendo também liberar no meio substâncias tóxicas prejudiciais ao crescimento do material *in vitro*.

No entanto, apesar dos dados não diferirem estatisticamente entre os tratamentos, concentrações de cloreto de benzalcônio iguais ou maiores que 0,05% aparentemente reduzem a contaminação dos explantes por bactérias quando comparado ao controle. A redução da contaminação bacteriana observada neste experimento utilizando concentrações de 0,5 a 0,1% demonstra o efeito já descrito do cloreto de benzalcônio (cloreto de alquildimetilbenzil amônio). De acordo com Gardner et al. (2000), o cloreto de benzalcônio apresenta como característica, uma elevada capacidade de reduzir a tensão superficial dos fluidos aquosos, tendo ação microbicida, e, mais especificamente, bactericida. No entanto, o mesmo autor salienta que para obter maior eficácia, é ideal que seja utilizado em concentrações inferiores a 1,0% e ajustando o pH entre 6 e 8, variável esta não ajustada neste experimento.

A diminuição da eficácia do surfactante cloreto de benzalcônio pode também ser devida à barreira protetora criada pela matéria orgânica em torno dos microrganismos, protegendo-os do ataque dos agentes antimicrobianos. Também deve-se levar em consideração que diferentes tecidos de uma mesma espécie podem ter respostas variadas quanto à concentração e ao tempo de exposição aos agentes desinfestantes.

Em cana de açúcar, Köppet al. (2009) verificaram que o cloreto de benzalcônio foi o tratamento de menor eficiência no que diz respeito a desinfestação dos explantes, observando em todos os genótipos estudados uma elevada porcentagem de contaminação, semelhante aos resultados obtidos neste experimento. Por outro lado, Vargas et al. (2012) demonstram que a desinfestação de explantes de batata (*Solanum tuberosum*) com cloreto de benzalcônio à 1% durante 5 minutos foi eficiente na esterilização superficial, obtendo-se baixos índices de contaminação.

Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio adicionado ao hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes

Foi constatado que entre as diferentes concentrações estudadas, o uso de peróxido de hidrogênio a 20% adicionado ao hipoclorito de sódio a 2,5% reduziu, em

relação ao controle, a contaminação por bactérias de 83% para 33%, representando um significativo controle da contaminação por este microrganismo (Figura 3).

Por meio dos resultados obtidos verificou-se que na ausência de peróxido de hidrogênio houve alto índice de contaminação dos explantes por fungos e bactérias, bem como oxidação dos explantes. Como pode ser observado na Figura 4, concentrações de peróxido de hidrogênio iguais ou superiores a 30% reduzem significativamente a contaminação fúngica.

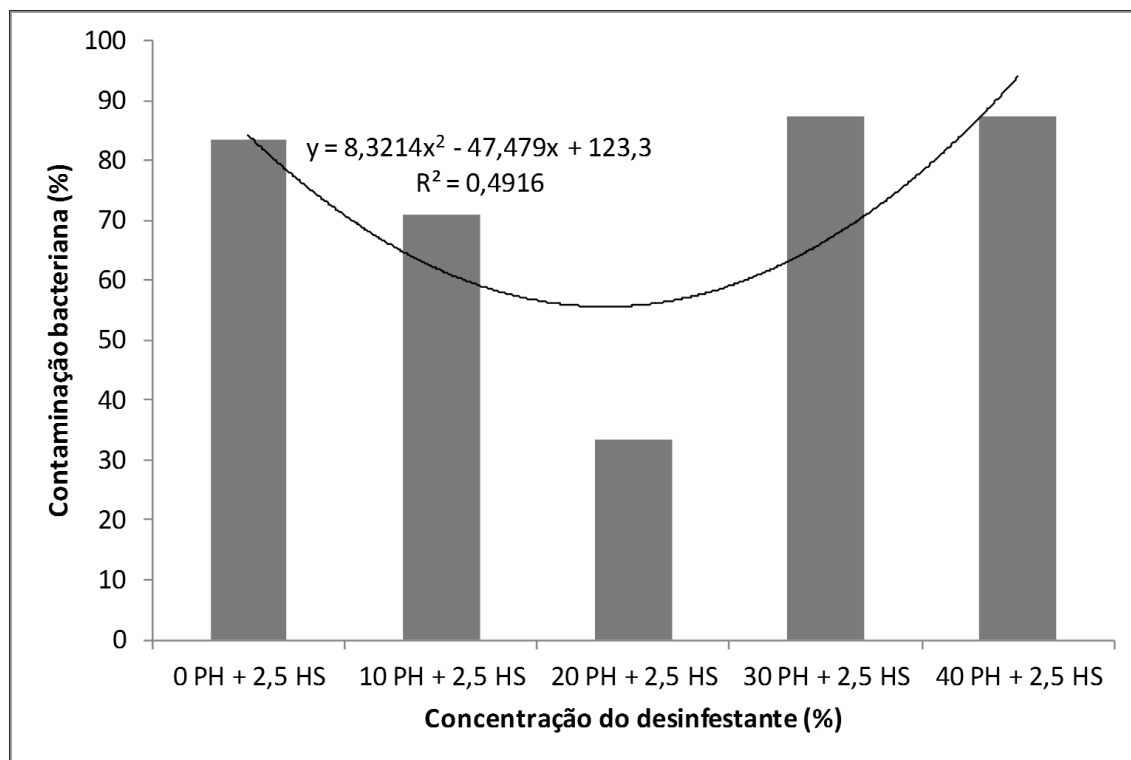


Figura 3. Porcentagem de contaminação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.

A contaminação microbiana é um constante problema, que frequentemente compromete o desenvolvimento de cultivos *in vitro*. A presença de microrganismos compete adversamente com os explantes cultivados principalmente por nutrientes, o que, pode causar uma alteração no desenvolvimento dos explantes, necrose dos tecidos, redução da proliferação das gemas, podendo também causar a morte dos explantes (OYEBANJI et al., 2009). Geralmente a assepsia dos explantes é realizada por meio de etanol e alvejantes comerciais à base de cloro como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e de cálcio (CaOCl₂) com teor de cloro ativo que pode variar de 2,0% a 2,5%. Um espalhante adesivo é utilizado a exemplo do Tween 80 (1 a 2 gotas/100

mL) nas soluções à base de cloro para aumentar a penetração dos agentes desinfestantes no tecido vegetal (PASQUAL, 2001). No entanto, esse processo convencional de assepsia pode não ser suficiente para eliminar completamente os microrganismos contaminantes, nesse caso, outros agentes antimicrobianos podem ser utilizados, tais como, antibióticos, fungicidas, cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio. As concentrações e o tempo de exposição dos agentes antimicrobianos podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária a adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (ERIG e SCHUCH, 2003). No presente trabalho verificou-se que a combinação de diferentes agentes microbicidas (peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio), é efetiva no controle da contaminação fúngica e bacteriana, porém, em concentrações diferenciadas.

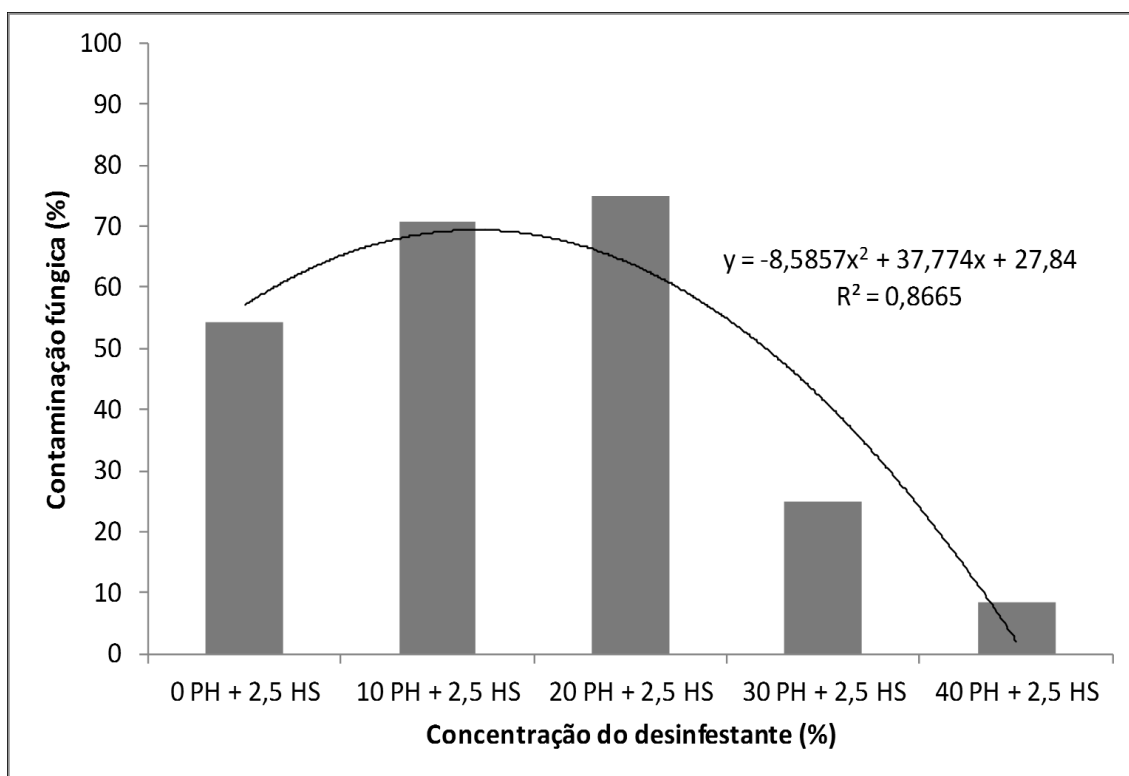


Figura 4. Porcentagem de contaminação fúngica no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.

Baseando-se nos resultados obtidos, é importante salientar que a presença de fungos e bactérias pode ser de origem endofítica. O problema é agravado quando explantes são provenientes diretamente a partir de plantas cultivadas de campo (ODUTAYO et al., 2007). De acordo com Pasqual et al. (2010), plantas matrizes

oriundas do campo ficam expostas a intempéries e insetos, que provocam ferimentos na planta, tornando-as mais susceptíveis a entrada de micro-organismos patogênicos.

Em relação à porcentagem de oxidação dos explantes (Figura 5), os índices obtidos foram baixos, não sendo esta variável aparentemente influenciada pela ação dos agentes desinfetantes utilizados, os quais, segundo por Grattapaglia e Machado (1998) tanto o hipoclorito de sódio, bem como, o peróxido de hidrogênio podem exercer um elevado poder oxidante sobre os explantes. Segundo Pasqual et al. (2002) o cloro, principal componente do hipoclorito, quando liberado em meio aquoso produz ácido hipocloroso, o qual tem como característica, elevado poder oxidante, por tanto, quanto menor a exposição ao hipoclorito, menor a oxidação dos explantes. A oxidação é atribuída à polifenoloxidase, uma enzima que catalisa a reação de orto-difenóis para orto-diquinonas causando o escurecimento do meio de cultura e dos explantes. Tal reação é desencadeada no processo de senescência das plantas ou por injúrias nos tecidos como, por exemplo, o corte do explante ou a utilização de agentes químicos no processo de desinfestação dos explantes (CID e TEIXEIRA, 2010).

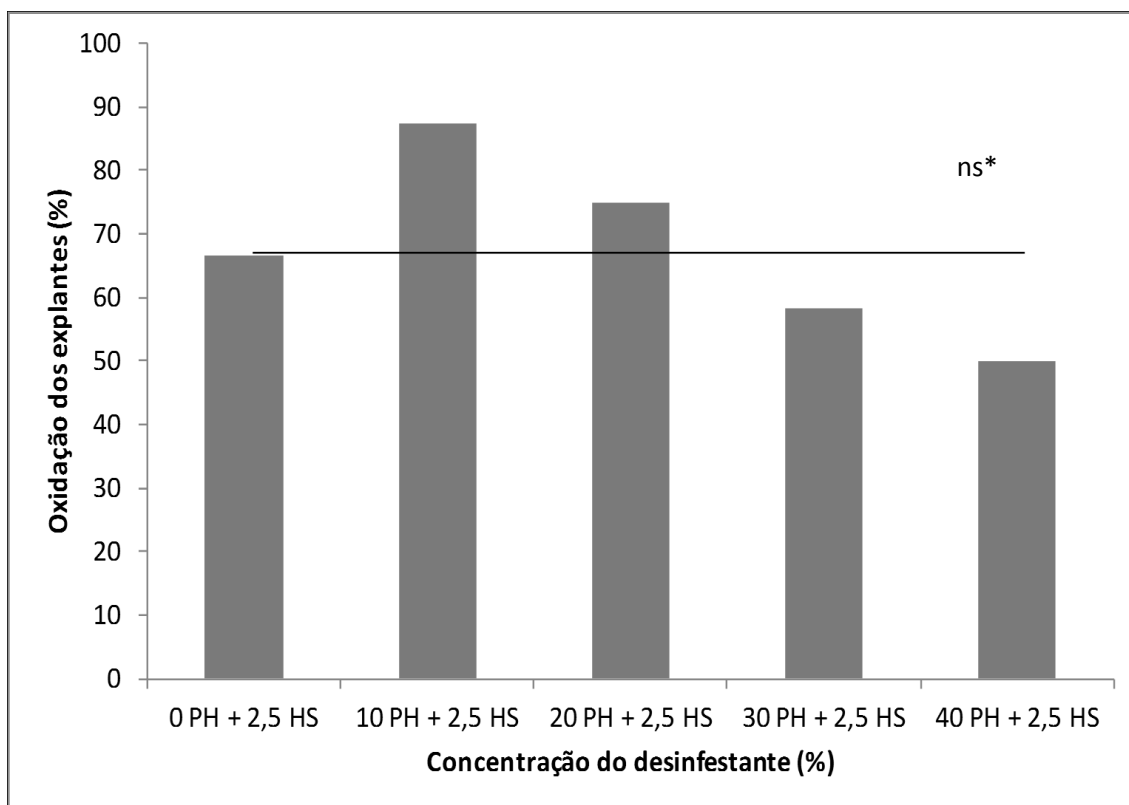


Figura 5. Porcentagem de oxidação dos explantes no estabelecimento *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. ns*: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A eficiência dos tratamentos com concentrações iguais ou superiores a 30% de peróxido de hidrogênio adicionadas ao hipoclorito de sódio no controle da contaminação e redução da oxidação dos explantes foi verificada no número de explantes estabelecidos *in vitro* (Figura 6). Como pode ser observado, explantes tratados com peróxido de hidrogênio a 30 e 40% adicionados ao hipoclorito de sódio a 2,5% apresentaram percentuais de estabelecimento de 38 e 42%, respectivamente, demonstrando que a combinação destes dois agentes desinfestantes são mais eficientes no controle da contaminação e oxidação dos explantes se comparado ao uso do hipoclorito de sódio isolado (tratamento controle), onde não houve estabelecimento, consequentemente pelo elevado grau de contaminação e oxidação dos explantes observado.

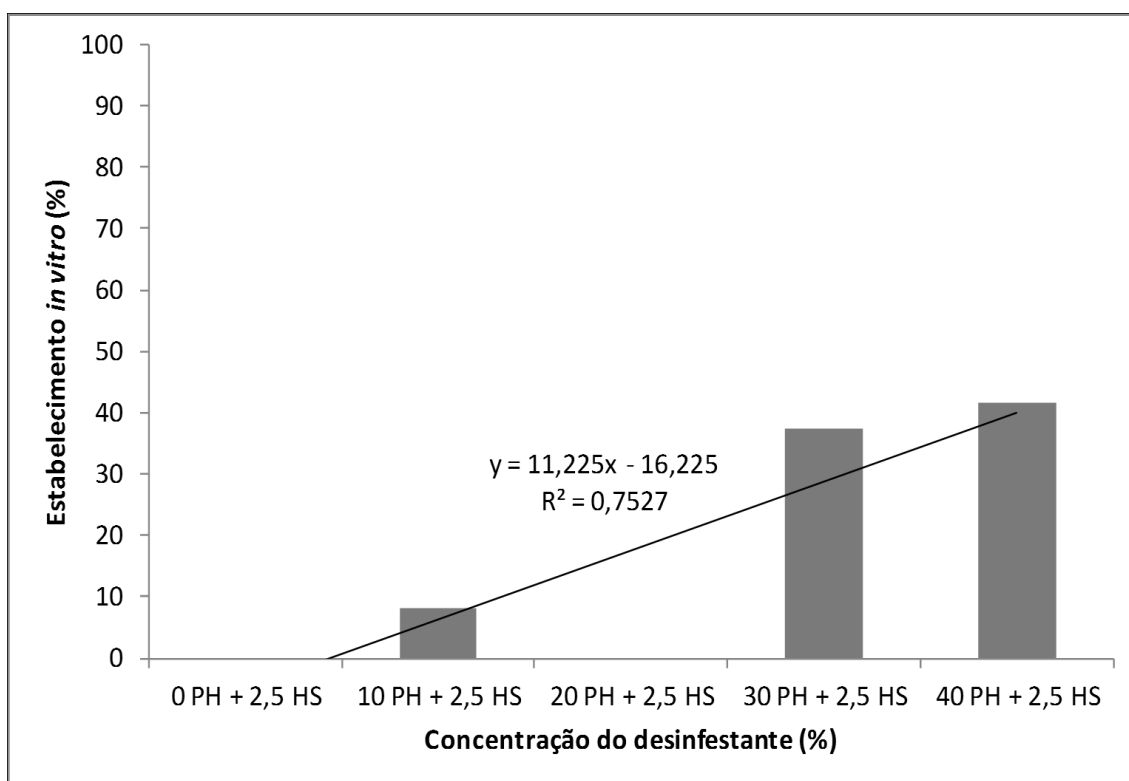


Figura 6. Porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de guavira (*Campomanesiaadamantium*) em função de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013.

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos concluiu-se que a esterilização superficial dos explantes de guavira com 0,025% de cloreto de mercúrio por 15 minutos reduziu a contaminação bacteriana de 65,6% para 18,8% e a oxidação dos explantes, de 53,1% para 12,5% quando comparado aos explantes tratados com hipoclorito de sódio

(controle). As concentrações de cloreto de mercúrio testadas neste experimento não foram eficientes para controlar a contaminação fúngica. O maior número de explantes estabelecidos (9,4%) foi obtido no tratamento com 0,1% de cloreto de mercúrio.

Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as concentrações de cloreto de benzalcônio e o nível de contaminações, é notável uma diminuição de explantes contaminados por bactérias em relação ao controle.

A adição de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 30 e/ou 40% ao hipoclorito de sódio a 2,5% foi eficiente na desinfestação dos explantes de guavira, controlando os níveis de contaminação fúngica e oxidação, permitindo a obtenção de maior número de explantes estabelecidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002, 16 p. (Documentos 58).
- CARMONA, R.; REZENDE, L.P.; PARENTE, T.V. Extração química de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.1, p.31-33, 1994.
- CASSELS, A.C.; DOYLE, B.M. Pathogen and biological contamination management: the road ahead. In: LOYOLA-VARGAS, V.M.; VÁZQUEZ-FLOTA, V.M. (eds.). **Plant cell culture protocols**. New York: Humana Press, p. 35-50, 2006.
- CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L.P.B. (Ed.) **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303p.
- DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.482 - 487, 2008.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de Macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.9, n. 3, p. 221-227, 2003.
- FERMINO JÚNIOR, P.C.P.; NAGAO, E.O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.
- GARDNER, W. P., GIRARD, J. E. Analysis of Common Household Cleaner-Disinfectants by Capillary Electrophoresis. **Journal of Chemical Education**. 10, 1335-1338, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology.** Great Britain: Exegetics Limited, v. 1, 1993. 574 p.

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: SPI/Embrapa - CNPH, v.1, p. 183-260, 1998.

KÖPP, M.M.; PASSOS, L.P.; SOUZA SOBRINHO, F.; VALE, N.M.; BARILI, L.D.; KELMER, G.A.R.; FILGUEIRAS, A.L.; MARQUES, R.; FERNANDES, F.S. Assepsia de propágulos vegetativos de cana-de-açúcar para cultivo *in vitro*. XVIII CIC-Congresso de Iniciação Científica XI ENPOS-Encontro de Pós-Graduação I Mostra Científica. Universidade Federal de Pelotas 20/23 de Outubro de 2009, Pelotas, RS, Brasil.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. Proceedings of the International Plant Propagation Society, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

MACHADO, A.A.; SILVA, J.G.C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A.R. **Winstat - sistema de análise estatística para Windows**, 1999.

MELCHIOR, S.J.; CUSTÓDIO, C.C.; MARQUES, T.A.; MACHADO NETO, N.B. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.28, n.3, p.141-150, 2006.

MOMESSO, L.S. **Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepinie* e *Chaetomium globosum*.** Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2008. 126p.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p. 5-10, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

ODUTAYO, O.I.; AMUSA, N.A.; OKUTADE, O.O.; OGUNSANWO, Y.R. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, v.2, n.3, p.67-72, 2007.

OYEBANJI, O.B.; NWEKE, O.; ODEBUNMI, O.; GALADIMA, N.B.; IDRIS, M.S.; NNODI, U.N.; AFOLABI, A.S.; OGBADU, G.H. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.20, p.5395-5399, 2009.

PARTELLI, F.L.; TAKEUCHI, K.P.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J. Frutas do Cerrado: Alternativa sustentável. **A lavoura**, Rio de Janeiro, n.676, p.12-15, 2010.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2001. 74p.

PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A. R. **Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.

PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. DE R.; CAMPOS, K.P. DE; SANTOS, E.C.; CAMPOS, R.J.C.DE. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.

PORTO, A.C.; GULIAS, A.P.S.M. Gabiroba. In: VIEIRA, R.F.; COSTA, T. da S.A.; SILVA, D.B. da; FERREIRA, F.R.; SANO, S.M. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, 322p.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

SAHA, S.; KADER, A.; SENGUPTA, C.; GHOSH, P. *In vitro* propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 64-74, 2012.

SCALON, S. de P. Q.; LIMA, A.A. de; SCALON FILHO, H.; VIEIRA, M. do C. Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb.: efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol.31, n.2, p.096-103, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 446p.

SEDLÁK J.; PAPRŠTEIN F. *In vitro* propagation of blue honeysuckle. **Horticultural Science**, v. 34, p. 129–131, 2007.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C.; FERRI, J.; SOARES, G.C.; Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

VALLILO, M.I.; LAMARDO, L.C.A.; GABERLOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E. de; MORENO, P.R.H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.805-810, 2006.

VARGAS, D.P.; DUTRA, L.F.; UENO, B.; CORADIN, J.H.; NINO, A.F.P.; PEREIRA, A.S.; CASTRO, C.M. Recuperação de plantas de batata ‘macaca’ contaminadas *in vitro* por meio da desinfestação com Fegatex®. XXV Congreso de la Asociación Latino americana de la Papa - ALAP, 17/20 de setembro de 2012, Uberlândia, MG, Brasil.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. 1ªEd. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2006, v.1, 322 p.

ANEXOS

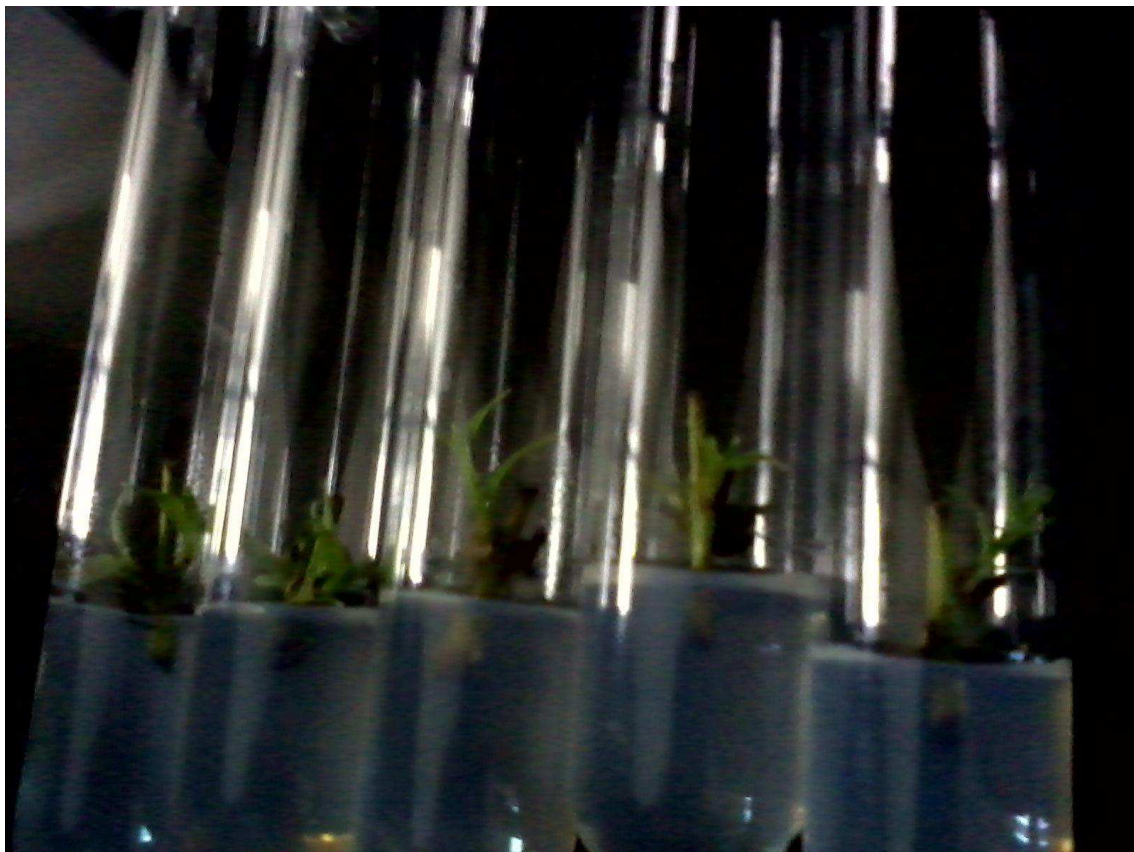


Figura 7: Explantes de guavira (*Campomanesia adamantium*) tratados com cloreto de mercúrio, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

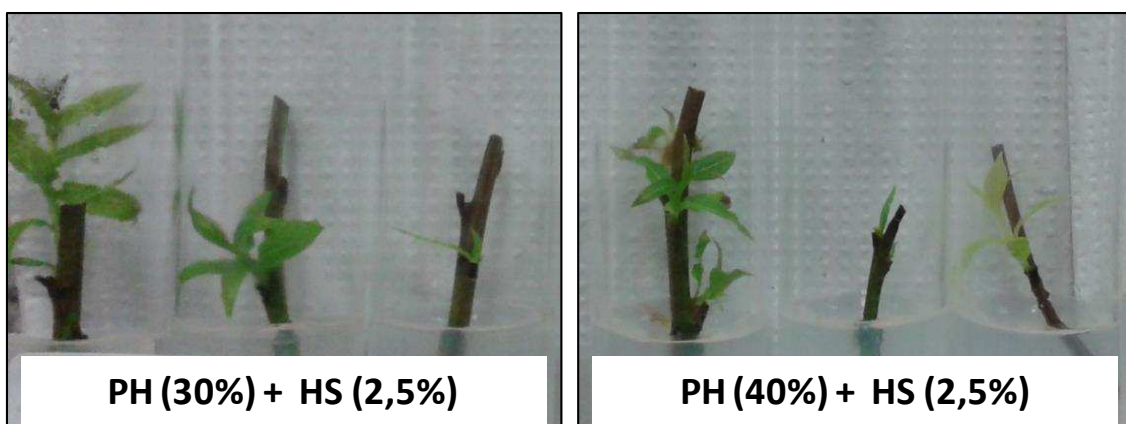


Figura 8: Explantes de guavira (*Campomanesia adamantium*) tratados com peróxido de hidrogênio (PH) + hipoclorito de sódio (HS), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.