



DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DE CAÇARI EM PRODUTOS QUÍMICOS SOB AGITAÇÃO ORBITAL NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS *IN VITRO*

DISINFESTATION OF CAÇARI EXPLANTS IN CHEMICAL PRODUCTS UNDER ORBITAL SHAKING IN THE CONTROL OF MICROORGANISMS *IN VITRO*

Beatriz Emanuela Pereira da Cruz¹; Maria Isabel Garcia Ribeiro²; Edvan Alves Chagas³; Marcos Eduardo Moraes Lima⁴; Emilly Vitoria Sobral Silveira⁵; Maria da Conceição da Rocha Araújo⁶; Kerolaine Beserra Braga de Souza⁷; Karolaine Lima de Sousa⁸.

¹Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. beatriz.e.p.c@gmail.com. Apresentador do trabalho.; ²Instituto de Educação e Inovação (IEDi), Av. Ville Roy, 1908 - Caçari, Boa Vista - RR, 69307-725, Brasil. be.l.s.g@hotmail.com.; ³EMBRAPA RORAIMA. BR 174, Km 8 sn - Boa Vista - Roraima, CEP 69301-970, Brasil. edvan.chagas@embrapa.br.; ⁴Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. marcoseduardomoraeslima@outlook.com.; ⁵Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR 174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. emillysilveira43@gmail.com.; ⁶Instituto de Educação e Inovação (IEDi), Av. Ville Roy, 1908 - Caçari, Boa Vista - RR, 69307-725, Brasil. nilmacoly@hotmail.com.; ⁷Instituto de Educação e Inovação (IEDi), Av. Ville Roy, 1908 - Caçari, Boa Vista - RR, 69307-725, Brasil. kerolainebbs@gmail.com.; ⁸Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. karolaine.sousalima@gmail.com.

INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa é o método mais utilizado quando se objetiva a manutenção das características genéticas agronomicamente desejáveis das plantas matrizes, permitindo uniformidade das mudas, porte reduzido e precocidade de produção (HARTMANN et al., 2011). Logo, a micropropagação é uma boa alternativa de propagação vegetativa para o caçari, pois permite a produção de mudas em grande escala e em ambiente artificial, que ao final do processo de regeneração de microtecidos, origina plantas com alto padrão genético e sanidade (OLIVEIRA et al., 2010).

Dessa forma, o controle de contaminação fúngica e bacteriana são empregadas frequentemente no cultivo *in vitro*, sendo uma boa opção o uso de antibióticos e fungicidas, combinados ou não, adicionados no meio de cultura para promover a redução de bactérias e fungos no cultivo *in vitro*, principalmente aqueles de caráter endógeno comum nas espécies lenhosas como o caçari (THAKUR; SOOD, 2006). Uma alternativa que pode influenciar no controle de fungos e bactérias *in vitro* é a agitação orbital dos explantes em solução de fungicida e antibiótico antes de serem inoculados no meio de cultura. (AHMADIAN et al., 2017; CARVALHO et al., 2019).

Assim, o explante em ambiente líquido e sob agitação tem maior aproveitamento de absorção por todas suas partes, favorecendo maior absorção de nutrientes e qualquer componente existente no líquido (COSTA et al., 2016). Logo, objetivou-se reduzir a contaminação fúngica e bacteriana *in vitro* de explantes de caçari utilizando diferentes produtos químicos associado a agitação orbital.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima, localizado em Boa Vista-RR. Onde para a instalação dos experimentos foram utilizados explantes do tipo



segmentos caulinares ($\pm 1,5$ cm comprimento) contendo um par de gemas, oriundas de plantas matrizes cultivadas no Campo Experimental Serra da Prata (CESP), localizado no municio de Mucajai – RR.

Os explantes coletados da planta mae ficaram imersos em solucao com antioxidante (100 mg L^{-1} de acido citrico) durante a coleta e trajetoria ate o laboratorio. No laboratorio, os explantes em camara de fluxo laminar, a solucao de antioxidante foi descartada, e em seguida a desinfestacao dos explantes, foi realizada por meio de uma solucao contendo diferentes antibioticos, na concentracao padrao de 100 mg L^{-1} , e isolados e/ou combinados, e em todos os tratamentos foram adicionado 2 ml L^{-1} do fungicida Derosal[®] (Carbendazim+Tiram). Os produtos foram adicionados no meio de cultura WPM liquido e distribuido 50 ml de cada solucao formada pelos antibioticos e concentracao padrao do fungicida em Erlenmeyer de 125 ml .

Os explantes foram transferidos para Erlenmeyer de 125 ml , e em seguida acondicionados em mesa agitadora modelo Tecnal[®] - 14I por 72 horas, a 100 RPM . Apes esse periodo, os explantes foram inoculados em dois meios de cultura: WPM basico sem adicao de fungicida e antibioticos e em meio de cultura WPM modificado contendo 100 mg L^{-1} de ceftriaxona + 2 ml L^{-1} de Nativo[®].

Os tratamentos foram compostos por dez combinacoes de antibioticos, sendo, T1= Ceftriaxona 100 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml L^{-1} Derosal[®]; T2= Ceftriaxona 100 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml L^{-1} Nativo[®]; T3= Ceftriaxona 100 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml L^{-1} Derosal[®] + 2 ml L^{-1} Nativo[®]; T4= Ceftriaxona 150 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml L^{-1} Derosal[®] + 2 ml L^{-1} Nativo[®]; T5= Ceftriaxona 300 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml L^{-1} Derosal[®] + 2 ml L^{-1} Nativo[®].

Para o preparo dos meios de cultura, agentes quimicos como fungicida e antibiotico foram adicionados no meio de cultura auxilio de micropipetador para adicionar a quantidade de cada tratamento quando o meio apresentou temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ verificada com o termometro portatil digital, apes a autoclavagem em camara de fluxo laminar. Apes esse processo os meios permaneceram em sala escura por sete dias, para verificar se nao houve contaminacao em virtude da manipulacao.

Apes esse periodo foi instalado o experimento, os explantes foram inoculados nos seus devidos tratamentos permanecendo por 15 dias em sala escura visando a reducao da oxidacao e, posteriormente, transferidos para sala de crescimento, com 16 horas de fotoperiodo, temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e luminosidade de $32 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, todos constituídos por 5 repeticoes, e cada repeticao composta por 8 explantes. Foram avaliados durante 30 dias, no intervalo de a cada 7 dias as seguintes variaveis: percentual de controle de fungos, percentual de contaminacao por bacterias, percentual de oxidacao. Os dados obtidos foram submetidos a analise de variancia, sendo os qualitativos analisados pelo teste de Tukey e Scott Knott ($p < 0,05$) pelo programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2019).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenca estatística apenas para as variáveis porcentagem de contaminação por fungos e oxidação ($p < 0,05$), (Tabela 1). Para contaminação por fungos (%) o tratamento 4 usando a combinaçao 150 mg de Ceftriaxona+ 100 mg de Amoxicilina +2 ml L⁻¹ de Derosal[®] e Nativo[®] foi o único tratamento que permitiu desinfestação eficiente, sendo não identificado contaminação. Seguindo desse resultado, destaca-se os tratamentos, T3 e T5, os quais permitiram reduçao na contaminação por fungos, respectivamente, 5,0% e 7,5%.

Quanto a contaminação por bactérias, os antibióticos e concentrações testadas nas devidas condições experimentais não condicionaram eficiência no controle, visto que, praticamente todos os tratamentos apresentaram 100% de contaminação por bactérias (Tabela 1).

A oxidação dos explantes foi expressiva diante dos tratamentos testados, principalmente quando houve a combinaçao dos quatros produtos (dois antibióticos e dois fungicidas), por isso os maiores percentuais encontrados foram observados nos tratamentos T3, T4 e T5, respectivamente, 50%, 52,5% e 50% de oxidação (Tabela 1).

TABELA 1 - Porcentagens de contaminação por fungos, bactérias e oxidação dos explantes quando submetidos a diferentes produtos químicos e meios de cultura no controle de microrganismos *in vitro*.

| Produtos | Contaminação (%) | | |
|---|------------------|-----------|--------------|
| | Fungos | Bactérias | Oxidação (%) |
| T1 Ceftriaxona 100 mg + Amoxicilina 100 mg + 2ml.L ⁻¹ Derosal [®] | 25 ab | 97,5 a | 12,5 b |
| T2 Ceftriaxona 100 mg + Amoxicilina 100 mg + 2ml.L ⁻¹ Nativo [®] | 47,5 a | 100,0 a | 32,5 ab |
| T3 Ceftriaxona 100 mg + Amoxicilina 100 mg + 2ml.L ⁻¹ Derosal [®] + 2ml.L ⁻¹ Nativo [®] | 5,0 b | 100,0 a | 50,0 a |
| T4 Ceftriaxona 150 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml.L ⁻¹ Derosal [®] + 2 ml.L ⁻¹ Nativo [®] | 0,0 c | 100,0 a | 52,5 a |
| T5 Ceftriaxona 300 mg + Amoxicilina 100 mg + 2 ml.L ⁻¹ Derosal [®] + 2 ml.L ⁻¹ Nativo [®] | 7,5 b | 100,0 a | 50,0 a |
| C.V (%) | 21,1 | 3,18 | 54,88 |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não se diferenciam pelo teste de Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Dessa forma, pode-se enfatizar que o uso dos dois fungicidas combinados (Derosal e Nativo) contribuíram satisfatoriamente para reduzir a contaminação por fungos, obtendo-se os menores percentuais. Por outro lado, a combinaçao dos fungicidas com antibióticos demonstraram excesso de conteúdo químico no meio de cultura causando efeito fitotóxico sobre os explantes, tendo-se os maiores percentuais de oxidação diante dessas composições. Neste aspecto, Dalauleng et al. (2020) também observaram que a combinaçao de produtos aumentou a eficiência no controle de fungos e bactérias no cultivo *in vitro* de ébano (*Diospyros celebica*), apresentando apenas 14% de contaminação quando testaram a imersão dos explantes em Fungicida Masalgin[®] 2%, bactericida Agrept[®] 2%, biocida PPM[®] (Plant Preservative Mixture), álcool 70% e cloro 50%, em tempos diferentes. Contudo, os autores observaram que as combinações dos produtos condicionaram alto percentual de explantes oxidados (71%), o que corrobora com os resultados obtidos nesse experimento.



Os tipos de antibióticos e concentrações testadas para o caçari neste estudo não foram satisfatórios para controlar bactérias, mesmo utilizando concentração baixa (100 mg) promoveu elevada oxidação. A sensibilidade dos explantes aos antibióticos é específica para cada espécie e depende em grande parte do tamanho e tipo de explante, condições de crescimento e o sistema de cultura (PETRI et al., 2008).

Aliado a isso, destaca-se também que neste trabalho foi utilizado a agitação orbital dos explantes imersos nos produtos químicos a fim de verificar sua eficiência no controle de contaminantes no cultivo *in vitro* do caçari, e obteve-se resultados satisfatórios no controle de fungos principalmente associado ao meio de cultura modificado, que potencializou a redução de fungos (Tabela 2), já para bactérias obteve-se resultado inverso, podendo ser associado ao próprio tipo de antibiótico e/ou concentração que não foi ideal para a espécie (VIDAL et al., 2015).

Quanto aos resultados para os meios de cultura, obteve-se diferença estatística ($p < 0,05$) para o meio modificado, demonstrando que a contaminação por fungos foi mais elevada no meio de cultura WPM básico (23%), do que no meio WPM modificado (11%), o qual contia fungicida e antibiótico em sua composição (Tabela 2). Já para a porcentagem de contaminação por bactérias não houve diferença estatística entre os meios de culturas WPM básico e modificado ($p < 0,05$) havendo elevada contaminação entre ambos, respectivamente, 99% e 100% (Tabela 2). Para a porcentagem de oxidação, menor média foi observado quando os explantes foram cultivados no meio WPM básico, o qual apresentou 21% de oxidação. Enquanto para o meio modificado foi obtido 58% (Tabela 2).

A ação de agitar os explantes permite maior oxigenação no ambiente, abertura dos poros do tecido, que conseqüentemente, propiciam maior contato/absorção de nutrientes do meio de cultura e das substâncias químicas de controle dos microrganismos, viabilizando o estabelecimento dos explantes, controle de bactérias e fungos *in vitro* (VIDAL et al., 2015), mas esses benefícios não contribuem se os próprios produtos químicos possuem características químicas fitotóxicas, o que pode ter refletidos nos resultados para antibióticos utilizados nesse estudo.

TABELA 2 - Porcentagens de contaminação por fungos, bactérias e oxidação dos explantes quando submetidos a diferentes meios de cultura no controle de microrganismos *in vitro*.

| Meios de cultura | Contaminação (%) | | Oxidação (%) |
|------------------|------------------|-----------|--------------|
| | Fungos | Bactérias | |
| Meio básico | 23,0 a | 99,0 a | 21,0 b |
| Meio modificado | 11,0 b | 100,0 a | 58,0 a |
| C.V (%) | 21,1 | 3,18 | 54,88 |

No presente trabalho ficou evidente por meio dos resultados que a combinação de diversos produtos expostos ao tecido tende a afetar a sobrevivência dos explantes, mesmo reduzindo o aparecimento de fungos e bactérias. E quando avaliado o meio de cultura pôde-se perceber essas



evidências, onde o meio com composição mais simples, sem adição de produtos químicos desinfestantes promoveu maior sobrevivência dos explantes, inversamente proporcional ao meio modificado. O mesmo resultado foi observado na germinação *in vitro* de *Colubrina glandulosa* Perkins (Rhamnaceae), a qual teve a germinação afetada quando foi submetida no meio de cultura modificado (contendo fungicida e NaClO) e não afetado quando germinado no meio de cultura simples (sem adição de produto químico).

CONCLUSÕES

O controle de fungos foi eficiente quando a agitação orbital dos explantes de caçari foi associado ao meio de cultura modificado;

A combinação de produtos químicos tanto na agitação orbital, quanto no meio de cultura afetou a sobrevivência dos explantes;

O efeito fitotóxico da combinação dos produtos sobre os explantes de caçari não permitiram estabelecer um protocolo inicial de controle de microrganismos;

AGRADECIMENTO

À Capes pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

AHMADIAN, M.; BABAEI, A.; SHOKRI, S.; HESSAMI, S. Micropropagação de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) em meio líquido por biorreator de imersão temporária em comparação com cultura sólida. **Jornal de Engenharia Genética e Biotecnologia**, v. 15, n. 2, pág. 309-315, 2017.

CARVALHO, L. S. O.; OZUDOGRU, E. A.; LAMBARDI, M.; PAIVA, L. V. Sistema de imersão temporária para micropropagação de espécies arbóreas: uma revisão bibliográfica e sistemática. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 2, p. 269-277, 2019.

COSTA, A. M.; FARIA, R. A. N.; LONDE, L. N.; RIBEIRO, E. B.; DAMASCENA, N. D. S. Cultivo *in vitro* da bananeira Prata Anã clone Gorutuba, em meio líquido, agitado e estacionário. **Revista Ceres**, v. 63, n. 3, p. 277-284, 2016.

DALAUENG, A.; GUSMIATY; PANANNANGAM, F.D.; RESTU, M. The optimization of *in vitro* sterilization on Ebony (*Diospyros celebica* Bakh) using shoot explants. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012021, 2020.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista brasileira de biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 915, 2011.

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M.G.C.; SILVA, C.V.; OTONI, W.C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.



PETRI, C.; LÓPEZ-NOGUERA, S.; ALBURQUERQUE, N.; EGEEA, J.; BURGOS, L. An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. **Plant science**, v. 175, n. 6, p. 777-783, 2008.

THAKUR, R.; SOOD, A. Um método eficiente para esterilização de explantes para redução da contaminação. **Cultura de células vegetais, tecidos e órgãos**, v. 84, n. 3, p. 369-371, 2006.

VIDAL, N.; BLANCO, B.; CUENCA, B. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, n. 2, p. 229-243, 2015.