



**Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal do Pará
Campus Universitário de Altamira
Faculdade de Ciências Biológicas**

GABRIEL ALVES DE SOUZA DA SILVA

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DA FLORESTA
AMAZÔNICA: USO DE PPM E DIOXIPLUS EM EXPLANTES FOLIARES E
SEMENTES**

Altamira, Pará

2023

Gabriel Alves de Souza da Silva

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DA FLORESTA AMAZÔNICA:
USO DE PPM E DIOXIPLUS EM EXPLANTES FOLIARES E SEMENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas do Campus de Altamira, Universidade Federal do Pará, para requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr. Raírys Cravo Herrera

Coorientadora: Prof^a. Dr. Tainá Teixeira Rocha

Altamira, Pará

2023

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DA FLORESTA AMAZÔNICA:
USO DE PPM E DIOXIPLUS EM EXPLANTES FOLIARES E SEMENTES**

Gabriel Alves de Souza da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Biologia da Universidade Federal do Pará,
campus de Altamira.

Banca examinadora:

Prof^ª.Dra. Raírys Cravo Herrera (orientadora)

Faculdade de Ciências Biológicas / UFPA

Prof^ª.Dra. Tainá Teixeira Rocha(coorientadora)

Faculdade de Ciências Biológicas / UFPA

Prof^ª.Dra. Magali Gonçalves Garcia (Banca Examinadora)

Faculdade de Ciências Biológicas / UFPA

Prof^ª. Dra. Fernanda Carlota Nery (Banca Examinadora)

Universidade Federal de Lavras / UFLA)

Altamira, 27 de fevereiro de 2023

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ALTAMIRA**

PARECER Nº 8 / 2023 - FACCIBIOLO (11.10.04)

Nº do Protocolo: 23073.029379/2023-86

Altamira-PA, 28 de abril de 2023.

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE TRÊS ESPÉCIES DA FLORESTA
AMAZÔNICA: USO DE PPM E DIOXIPLUS EM EXPLANTES FOLIARES**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas, pela banca examinadora, formado pelos professores:

Orientadora:

Profª. Drª. Raírys Cravo Herrera

Faculdade de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Magali Gonçalves Garcia

Faculdade de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery

Universidade Federal São João Del Rei (UFSJ)

*(Assinado digitalmente em
03/05/2023 10:54)*
RAIRYS CRAVO HERRERA
PROFESSOR DO MAGISTERIO

SUPERIORCALTA (11.10)
Matricula: ###430#5

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpa.br/public>

[/documentos/index.jsp](#) informando seu número: **8**, ano: **2023**, tipo: **PARECER**, data de emissão: **28/04/2023** e o código de verificação: **4c54545757**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

A474e Alves de Souza da Silva, Gabriel.
ESTABELECIMENTO IN VITRO DE TRÊS ESPÉCIES DA FLORESTA
AMAZÔNICA: USO DE PPM E DIOXIPLUS EM
EXPLANTES FOLIARES E SEMENTES / Gabriel Alves de Souza da Silva. —
2023.
25 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Raírys Cravo Herrera
Coorientação: Prof^a.
Dra. Tainá Teixeira Rocha
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Altamira, Faculdade de Ciências Biológicas, Altamira, 2023.

1. assepsia. 2. contaminação. 3. espécies florestais. I. Título.

CDD 660.6

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por todo carinho, que não mediu esforços para me proporcionar educação de qualidade e sem os quais teria sido impossível chegar à reta final deste curso de graduação.

Ao meu namorado, Carlos Jean, por todo amor, compreensão e incentivo.

As minhas melhores amigas que sem as quais as rotinas teriam sido bem mais difíceis.

Ao grupo Biotec, que me carregou nas ranqueadas, proporcionando momentos ímpares de lazer e trabalho em equipe. Em especial, Dr^a. Tainá Teixeira, Hairon Antônio, Brenda Tayná Souza e Israeli Ingrid e Silvia Monteiro.

À minha orientadora que tive na FCB e amiga, Raírys Cravo Herrera, que além dos ensinamentos nas Ciências Biológicas, me proporcionou uma visão diferente do mundo com seus “assuntos aleatórios e baguncinhas pela sala”. Obrigado pela paciência, orientação e por tudo que me ensinastes ao longo da graduação. Para mim, a senhora sempre será minha orientadora!

A todos e todas que acreditaram em meu sonho e que contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	4
2 MATERIAL E MÉTODOS	8
Experimento com PPM®	9
Experimento com Dioxiplus® (NaClO).....	9
Experimento com Dioxiplus ®(NaClO) em sementes	9
Análises Estatísticas	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
Experimento de PPM®.....	11
Experimento com Dioxiplus® (NaClO).....	14
5 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20

RESUMO

A propagação *in vitro* é considerada uma alternativa para propagação de árvores, visto que oferece a possibilidade de obtenção de plantas previamente selecionadas, oportuniza a limpeza clonal, superando problemas de contaminação patogênica. A fase inicial de estabelecimento *in vitro* é um momento decisivo, pois mesmo utilizando rígidas condições de esterilização, há muitas contaminações causadas por microrganismos, tornando-se um desafio constante que ameaça a cultura de tecidos vegetais durante esta fase e as próximas. Objetivou-se avaliar os efeitos de PPM[®] e Dioxiplus[®] no estabelecimento *in vitro* de *Vouacapoua americana* Aubl, *Dyterixodorata* Aubl. e *Bagassaguianensi* Aubl. Os experimentos foram realizados com explantes foliares coletados de matrizes cultivadas em viveiro de *V. americana*, *D. odorata* e *B. guianensis* e sementes de *B. guianensis* coletadas em campo. Os explantes passaram por pré-asepsia com leve escovação das folhas com detergente líquido e lavagem em água corrente, em seguida o material foi transferido para capela de fluxo laminar onde ocorreu o processo de assepsia, onde os segmentos foliares e sementes foram submersos durante um minuto em álcool etílico 70% e, posteriormente, em hipoclorito de sódio comercial 2% por 10 ou 30 minutos, seguindo-se de tríplice lavagem com água destilada. Os explantes foliares no experimento com PPM[®] foram inoculados em meio de cultura contendo concentrações de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL L⁻¹ de PPM[®]. Já no experimento com Dioxiplus[®] foi utilizado a concentração de 3,0 mL g L⁻¹ do sanitizante e outras diferentes condições de tratamento. O PPM[®] foi mais eficaz nas concentrações de 1,5 mL L⁻¹ e 2 mL L⁻¹ após 10 dias de análise, sua eficácia diminuiu proporcionalmente em níveis inferiores. O uso da esterilização com hipoclorito de sódio estabilizado 4% encontrado no produto Dioxiplus[®] na concentração de 3 mL L⁻¹, resultou em 100% de descontaminação dos explantes foliares, pois após 10 dias de inoculação não mostrou sinais de futuras contaminações. As sementes de *B. guianensis* não demonstraram contaminação de nenhuma estância microbiana, mesmo no tratamento sem nenhum biocida no meio de cultura.

Palavras-chave: assepsia; contaminação; espécies florestais.

1 INTRODUÇÃO

Haja vista que a Amazônia possui uma grande riqueza vegetal, com milhares de espécimes vegetais, muitas das quais ainda não classificadas ou conhecidas pela ciência, nesse contexto crescem as possibilidades de uso dessas espécies, seja para o aproveitamento de aromas, sabores, fibras, óleos, ou para a criação de novos fitoterápicos (CORADIN; CAMILLO; VIEIRA, 2022).

Dado isso, as espécies florestais são de grande interesse para a movimentação econômica, já que delas advêm uma extensa diversidade de produtos como madeira para fabricação de mobiliários, biomassa para a produção de pasta de celulose, papel e carvão vegetal para energia industrial, bem como uma gama de subprodutos florestais não-madeireiros que são comercializados para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (STUDART; GUIMARÃES et al., 2003).

A cultura de tecidos pode ser a técnica biotecnológica, mais rápida e eficaz na multiplicação de plantas em ambiente pequeno e controlado, visto que é independente da estação do ano e das disposições climáticas (PEREIRA, 2012; CONCEIÇÃO; CARMO; LIMA-BRITO, 2021). Esse sistema fornece todos os nutrientes necessários para o desempenho fisiológico do vegetal, provendo assim, energia e água necessários para que possa crescer através do meio basal (PHILLIPS; GARDA, 2019). O principal problema com o estabelecimento da cultura in vitro para muitas espécies florestais, é a contaminação severa do material de campo por patógenos bacterianos e fúngicos (ORLIKOWSKA et al. 2017).

Nisto, a micropropagação de espécies lenhosas vem sendo pesquisada há décadas e tem como propósito primário o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação em maior escala de mudas idênticas, como também a pluralização clonal de indivíduos com características superiores (DE FREITAS, 2009).

Dentre essas espécies, encontra-se o acapu (*Vouacapoua americana* Aubl.) que vem sendo bastante utilizado no setor florestal, por possuir madeira de boa viabilidade na construção de estacas, esteios e mourões em cercas (ABREU et al., 2018). Assim como existe um grande interesse madeireiro em torno dos recursos provenientes da tatajuba (*Bagassa guianensis* Aubl.) (CARVALHO, 2004). Cita-se ainda o cumaru (*Dipteryx odorata* Aubl.) conhecida pela exploração comercial, devido a qualidade dos móveis obtidos a partir da sua madeira (STASI et al., 2002).

Também é utilizado como substituto da fragrância de baunilha para aromatizar produtos, e o uso de altas doses do fármaco, warfarina da classe das cumarinas substância presente encontrada em diversas partes de plantas, tanto em raízes como em flores e frutos é usada para veneno de roedores (FRANCO et al., 2021).

Dentre as diversas possibilidades de propagação vegetativa, uma das vias possíveis é a utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação (CONCEIÇÃO; CARMO; LIMA-BRITO, 2021). A primeira etapa começa com a seleção de tecidos vegetais (explantes) de uma planta saudável, nesta fase de iniciação o explante é esterilizado e transferido para meio de cultura com nutrientes, sugere-se na aplicação da assepsia o uso de produtos bactericidas e fungicidas (HUSSAIN et al, 2012)

Na ausência de contaminação, os explantes passam para a fase de multiplicação, com objetivo de aumentar o número de propágulos no meio, para o cultivo de uma plântula através da multiplicação é necessário adicionar composições de reguladores de crescimento para induzir o enraizamento e desenvolvimento de um forte crescimento radicular ou a indução foliar para o crescimento apical do explante (CARVALHO, 2006).

Nesse contexto, a fase de estabelecimento *in vitro* é um momento decisivo no cultivo de plantas. Apesar das rígidas condições de esterilização que normalmente são empregadas nos protocolos, há muitas contaminações causadas por microrganismos, principalmente bactérias, fungos, leveduras e vírus, tornando assim, um desafio constante que ameaça a cultura de tecidos vegetais durante esta fase (LEIFERT; CASSELLS, 2001; ORLIKOWSKA et al. 2017; KUSHNARENKO et al., 2022).

Os explantes para a fase inicial do cultivo *in vitro* são geralmente habitados por inúmeros microrganismos não apenas em sua superfície (epífitas) que geralmente são facilmente removidas por procedimentos de desinfestação de superfície de comum; no

entanto, esse tratamento não elimina os microrganismos dos tecidos internos (endofíticas) (ORLIKOWSKA et al. 2017; (ŞEKER et. 2017; KUSHNARENKO et al., 2022).

Visando a obtenção de explantes assépticos, são utilizados produtos químicos para a desinfestação inicial dos explantes, e o álcool (C_2H_6O), agindo como um desnaturador proteico contra contaminantes microbianos, além de conter eficácia como detergente auxiliando na remoção de microrganismos (PEREIRA, 2012); e o cloro na forma de hipoclorito de sódio ($NaOCl$), com aspecto biocida contra bactérias, vírus e fungos (TEIXEIRA et al., 2012), por isso é o antimicrobiano mais funcional e disseminado para lavagem de produtos e saneamento de água e esterilização de superfície (GIL et al., 2009).

Plant preservative mixture (PPM[®]) é produzido pela Plant Cell Technology (Washington, D.C., USA) também uma alternativa comercial de desinfetante químico utilizado tanto no meio de cultivo, como no processo de assepsia dos explantes. É uma combinação de dois biocidas de isotiazolona industrial de amplo espectro (clorometilisotiazolona e metilisotiazolona), sendo estável ao calor e, portanto, pode ser autoclavado (LUNGHUSEN, 1998; ROMADANAVA et al., 2022). Sendo utilizado no cultivo *in vitro* de plantas como noz (*Juglans regia* L.) (KUSHNARENKO ET AL., 2022) e grupo de acácia (família Leguminosae, subfamília Mimosaceae) (HO et al., 2022)

Outro produto que vem se tornando eficiente é Dioxiplus[®] produzido pela Dioxide Ind. Quimica Ltda. (Indaiatuba, SP., BRASIL) no qual sua formulação consiste de hipoclorito de sódio estabilizado 4% ($NaClO$), assim sendo um desinfetante com ação antimicrobiana, cujo princípio ativo é o hipoclorito estabilizado, usualmente utilizado pós colheita e também sendo utilizado na esterilização química de meio de cultivo podendo substituir o processo de autoclavagem, sendo usado com sucesso no cultivo *in vitro* de plantas como sequóia (*Sequoia sempervirens* L.) (RIBEIRO et al., 2011) e eucalipto (*Eucalyptus pellita* L. e *Eucalyptus benthamii*) (TEIXEIRA et al., 2008; BRONDANI et al., 2013)

Iniciar e manter culturas de tecidos vegetais livres de contaminação é difícil para muitas espécies, especialmente para plantas lenhosas (KUSHNARENKO et al., 2022). Em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas a propagação *in vitro* pode advir como uma alternativa, visto que oferece a possibilidade de propagação de árvores previamente selecionadas, oportuniza a limpeza clonal, superando problemas de contaminação patogênica (WENDLING et al., 2006).

Diante da grande demanda comercial e ecológica das três espécies florestais estudadas neste trabalho (*Vouacapoua americana* Aubl., *Bagassa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* Aubl.) o desenvolvimento de um protocolo de estabelecimento deve conter as etapas da desinfestação, apresentando uma combinação ideal do tempo de exposição para cada espécie e concentração do agente desinfestante, com resultados promissores para a propagação por cultura de tecidos de plantas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de PPM e Dioxiplus[®] como agentes desinfetantes no estabelecimento *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Pará – UFPA/*Campus* Altamira (BIOTEC-ATM). Explantes foliares jovens das três espécies florestais (*de Vouacapoua americana* Aubl, *Dyterixodorata* Aubl. e *Bagassaguianensi* Aubl) foram coletados de mudas mantidas em viveiro da Faculdade de Ciências Biológicas. Em laboratório, os segmentos foliares passaram por pré-asepsia com leve escovação das folhas com detergente líquido e lavagem em água corrente por 30 minutos, em seguida o material foi transferido para capela de fluxo laminar onde ocorreu o processo de asepsia. Os segmentos foliares foram submersos durante um minuto em álcool etílico 70% e,

posteriormente, em hipoclorito de sódio comercial a 2% por 10 minutos, seguindo-se de tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Experimento com PPM[®]

Após assepsia, os explantes foliares foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com Phytigel[®] (PHYTOTECNOLOGY LABORATORIES), a 2,5 g L⁻¹ e em diferentes concentrações de PPM[®] nas concentrações de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL mL⁻¹ e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A autoclavagem se deu por 20 minutos sob pressão de 1 kgf/cm² e temperatura 121 °C. Utilizou-se no total 75 frascos, sendo 25 de cada espécie resultando em 3 explantes por tratamento, com 5 repetições cada. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 24 °C e no escuro. Aos 10 dias, foi avaliado a contaminação dos explantes.

Experimento com Dioxiplus[®] (NaClO)

Segmentos foliares foram das espécies *V. americana*, *D. odorata* e *B. guianensis* passaram por pré-assepsia e assepsia já descritos anteriormente e inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com Phytigel[®] a 2,5 g L⁻¹ e em diferentes condições de tratamento, sendo respectivamente: (T0) meio autoclavado, (T1) meio com PPM[®] 2,0 mL mL⁻¹ autoclavado, (T2) meio com PPM[®] 2,0 mL mL⁻¹ sem autoclavar, (T3) meio com Dioxiplus[®] 3 mL g L⁻¹ sem autoclavar.

Experimento com Dioxiplus[®](NaClO) em sementes

As sementes de *B. guianensis* foram coletadas de matriz oriunda de campo, pois estavam no tempo de frutificação do fruto, diferente das outras espécies. Com intermédio de colaboradores nas coordenadas 03o10'47,40'' S e 51o58'00,76'' W. As exsiccatas de

identificação da espécie foram depositadas no Herbário Padre José Maria Albuquerque (H-ATM), com os números 2317, 2318 e 2319 para *D. odorata* e autorização SISBIO no. 68708-1.

Em laboratório as sementes passaram por pré-asepsia por meio de remoção da mucilagem (com auxílio de peneira e água corrente) com leve movimentos de rotação e fricção e lavagem em água corrente com detergente por 30 minutos, em seguida o material foi transferido para capela de fluxo laminar onde ocorreu o processo de asepsia. As sementes foram submersas durante um minuto em álcool etílico 70% e, posteriormente, em hipoclorito de sódio comercial 2% por 30 minutos, seguindo-se de tríplice lavagem com água autoclavada. As sementes foram inoculadas em frascos contendo os mesmos aspectos do experimento anterior.

Análises Estatísticas

Por tratar de dados expressos por ausência/presença de contaminação nos explantes, ou seja, a contabilidade era feita com tabulação dos dados de forma que o explante com presença de contaminação era enumerado com 0 e quando não ocorria contaminação esse dado era expresso com 1. Assim ficaria notório a expressão da eficácia dos tratamentos. Utilizou-se a transformação $\arcsen \sqrt{P\%/100}$. Após a coleta de todas as informações possíveis, os dados foram analisados pelo software RStudio (versão 02.3-492 para Windows[®], Microsoft Corporation – EUA). Foi realizada a análise de homogeneidade pelo teste estatístico Levene ($p < 0,05$) e para a verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento de PPM®

A variação dos dados da eficiência dos tratamentos de desinfestação dos explantes das espécies florestais *V. americana*, *D. odorata* e *B. guianensis*. com o uso de adição de PPM® no meio de cultura e relação do controle à formação e desenvolvimento de microrganismos como bactérias e fungos realizados após 10 dias de inoculação representados na figura 1. Desinfestar o explante com cloro, seguido de exposição ao PPM® no meio de cultura para controlar qualquer contaminação residual constituiu-se eficaz assim como dito por NIEDZ e BAUSHER (2002). Sua efetividade foi analisada em diversas concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mL L⁻¹) figura 1.

1.

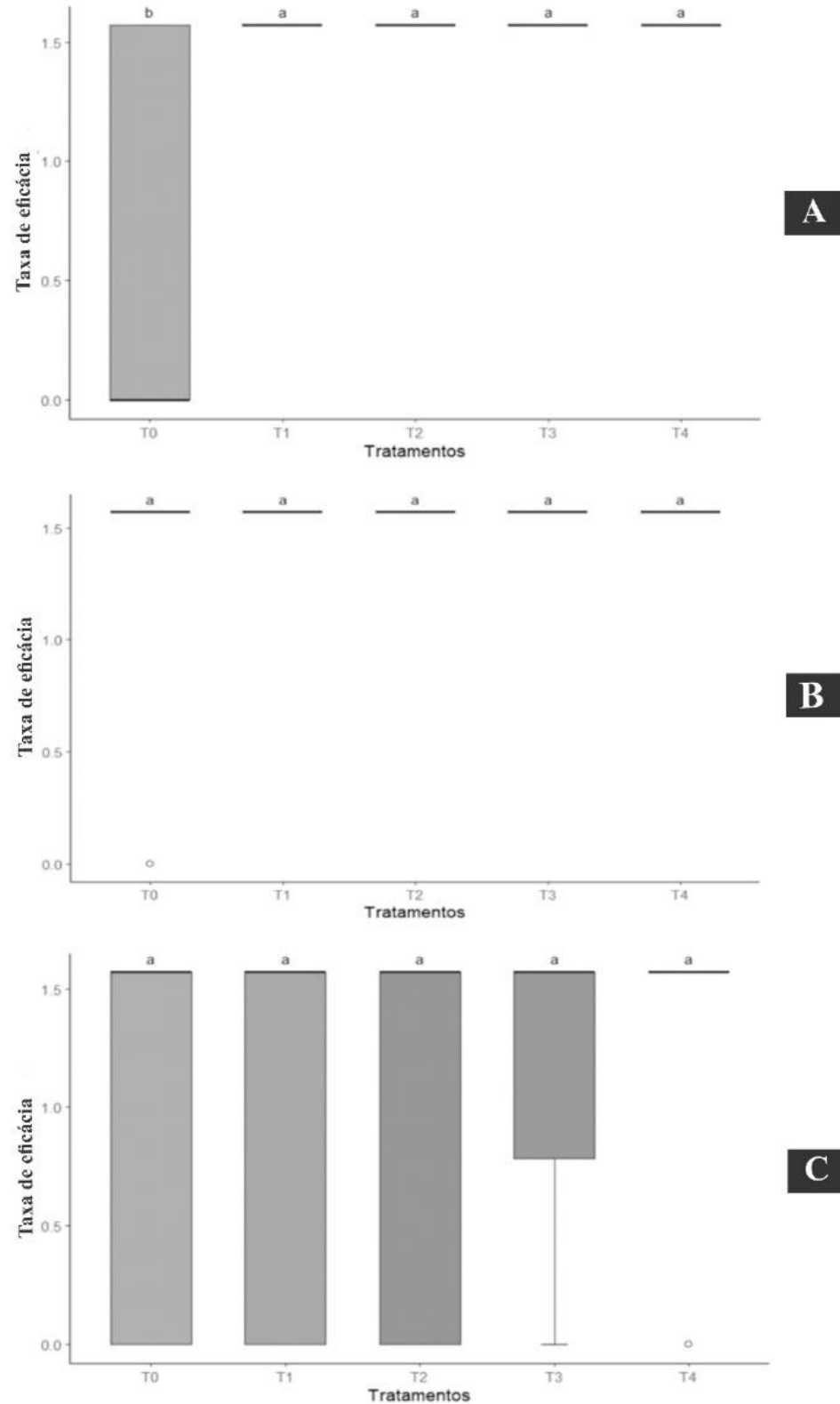


Figura. 1- Taxa de eficácia dos tratamentos com explante de (A) *V. americana*, (B) *D. odorata* e (C) *B. guianensis*. em concentrações de PPM® em 10 dias. (T0) 0 mL L⁻¹, (T1) 0,5 mL L⁻¹, (T2) 1,0 mL L⁻¹, (T3) 1,5 mL L⁻¹, (T4) 2,5 mL L⁻¹.

O teste de Kruskal-Wallis demonstra dado significativo nos explantes de *V. americana* (A) pois o valor de $p=3.64e-08$ é menor que 0,05. (T0) difere-se dos demais tratamentos, pois apresenta número de contaminação em maior quantidade, manifestando contaminação em todos os fracos do tratamento dentre os 10 dias de avaliação. No entanto, nos explantes de *D. odorata* (B) a análise indicou que os efeitos não foram significativos (valor de $p= 0.08765$ maior que 0,05) em relação a eficácia ao uso de diferentes concentrações de PPM[®] nos tratamentos visto uma indiferença entre os tratamentos, no qual não ocorreu nenhuma instancia de contaminação entre os explantes analisados, sendo que no tratamento controle a pré-asepsia e asepsia controlaram a contaminação. No experimento com explante de *B. guianensis* (C) pode-se observar que não ocorreram efeitos significativos em relação ao uso de diferentes concentrações de PPM[®] nos tratamentos (valor de $p= 0.8072$ maior que 0,05). Eventualmente, isso ocorreu por conta de o número contaminação ter sido presente em todos os tratamentos apesar de ter sido em pequeno número, mesmo naqueles com concentrações mais altas.

Ocasionalmente, as contaminações nos explantes apresentava colônias fúngicas esféricas e filiação de bactérias (Figura 2), porém em menor número, isso foi observado nos tratamentos contendo 0 e 0,5 mL L⁻¹ PPM[®] e com quase nenhuma frequência nos tratamentos 1,5 mL L⁻¹ e 2 mL L⁻¹ PPM[®].

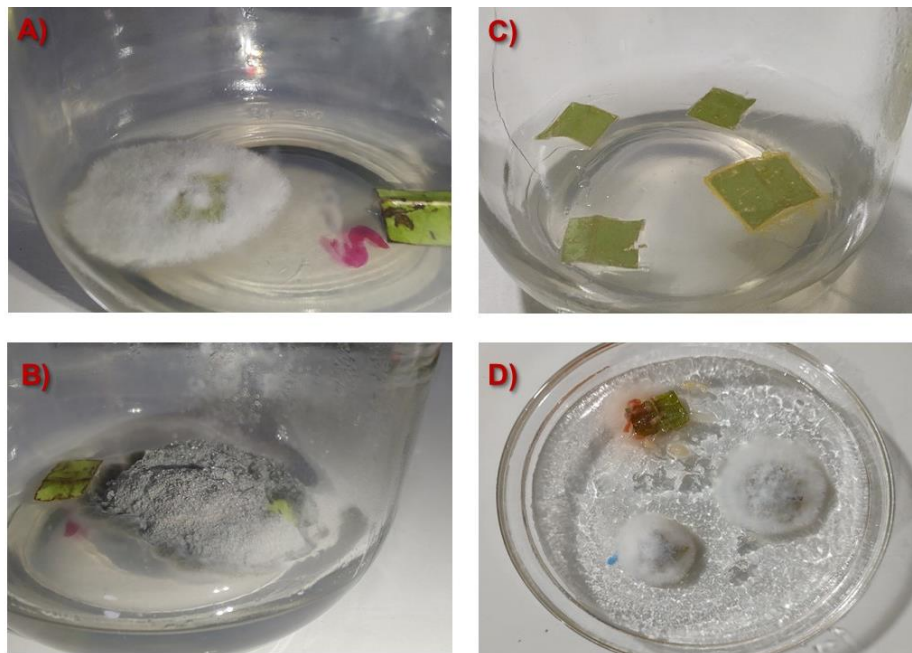


Figura. 2 - Diferentes contaminações de microrganismos nos explantes foliares de *B. guianensis*. (A) e (B) tratamento T0. (C) e (D) Tratamento T1.

Experimento com Doxiplus® (NaClO)

Conforme observado, o uso da esterilização química com Doxiplus® (NaClO) a 3 mL L⁻¹ obteve 100% de eficácia nos frascos com explante de *V. americana*, *D. odorata* e *B. guianensis* dentre os 10 dias de análise representados na figura 3. No entanto, nos tratamentos com PPM® autoclavado 2,0 mL mL⁻¹ e sem autoclavar 2,0 mL mL⁻¹ o resultado foi semelhante para as três espécies. No geral houve reações semelhantes sobre a implementação do Doxiplus® como esterilizador químico figura 3.

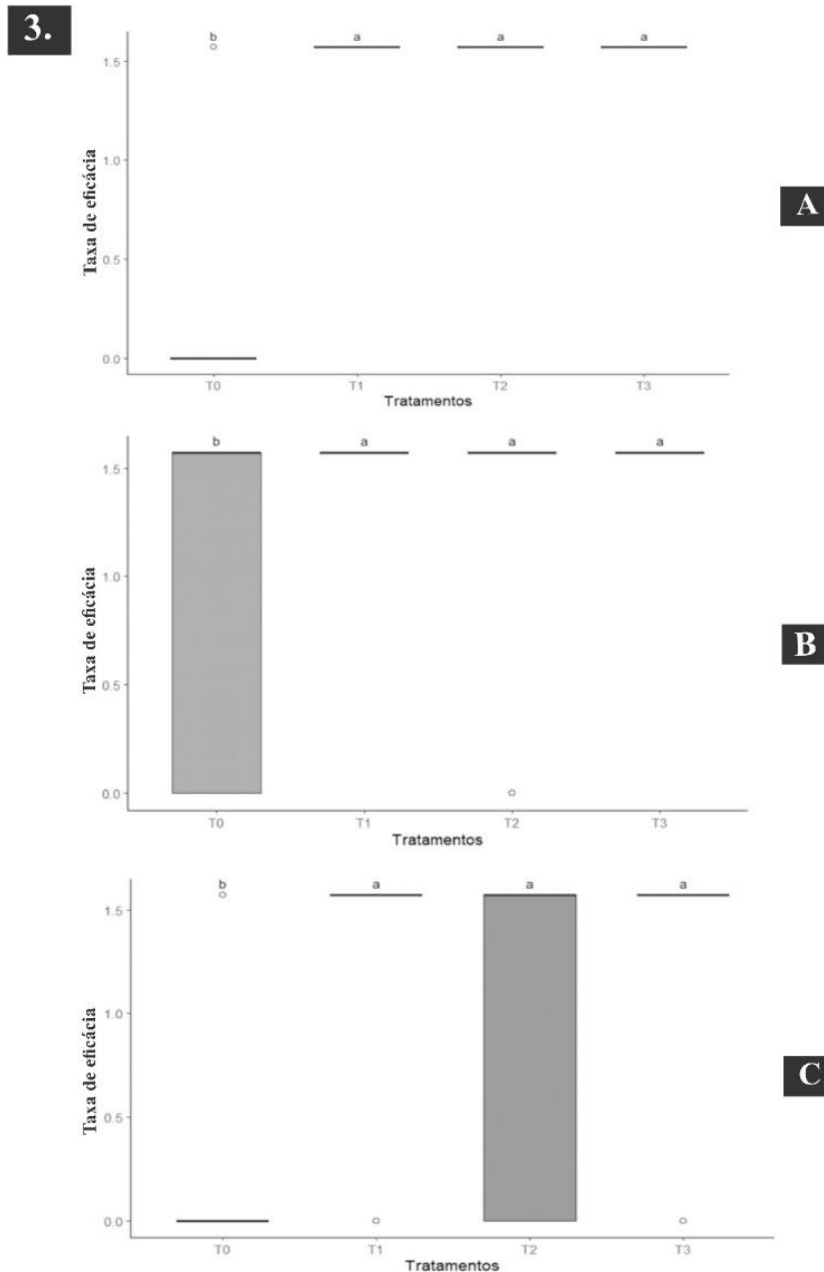


Figura. 3- Taxa eficácia dos tratamentos com explante de (A) *V. americana*, (B) *D. odorata* e (C) *B. guianensis* em diferentes condições de tratamento. T0 (meio autoclavado), T1 (meio com PPM® 2,0 mL mL⁻¹ autoclavado) T2 (meio com PPM® 2,0 mL mL⁻¹ sem autoclavar) T3 (meio com Dioxiplus® 3 mL g L⁻¹ sem autoclavar).

O teste de Kruskal-Wallis demonstra dado significativo nos explantes de *V. americana* (A) pois o valor de $p=1.335e-09$ é menor que 0,05. Assim como nos explantes de *D. odorata* (B) $p= 0.00128$ é menor que 0,05 onde teve esterilização total do meio de cultura, não havendo qualquer tipo de contaminação no meio de cultura, mostrando eficácia do Dioxiplus®.O experimento com explantes de *B. guianensis* foi significativo (C) $p=187e-06$ menor que 0,05 observou-se a esterilização total do meio de cultura, não havendo qualquer tipo de contaminação ou sinais de microrganismos no meio de cultura mostrando eficácia de seu uso meio de cultura.

As contaminações nos explantes apresentava colônias fúngicas esféricas e filiação de bactérias no tratamento apenas cmm o uso da autoclave (Figura 4).

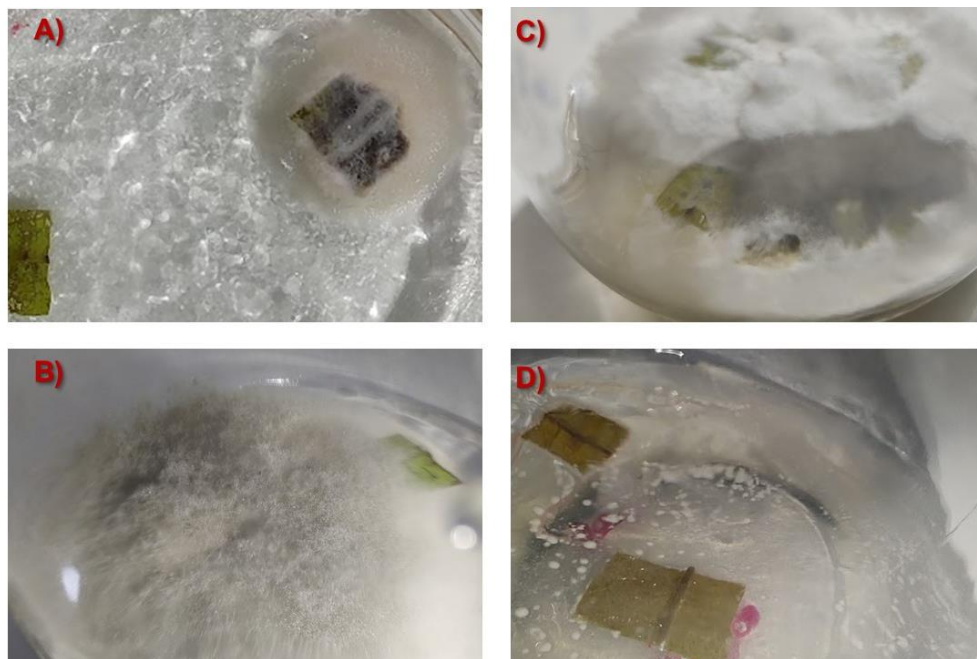


Figura. 4 - Diferentes contaminações de microrganismos nos explantes foliares de (A) *V. americana*, (B) *D. odorata* e (C e D) *B. guianensis*.

Experimento sementes de *B. guianensis*.Observou-se que não houve diferença entre os tratamentos, assim não havendo qualquer tipo de contaminação ou sinais de microrganismos no meio de cultura dos diferentes testes, mesmo no tratamento que não possui nenhuma concentração de esterilização figura 5.

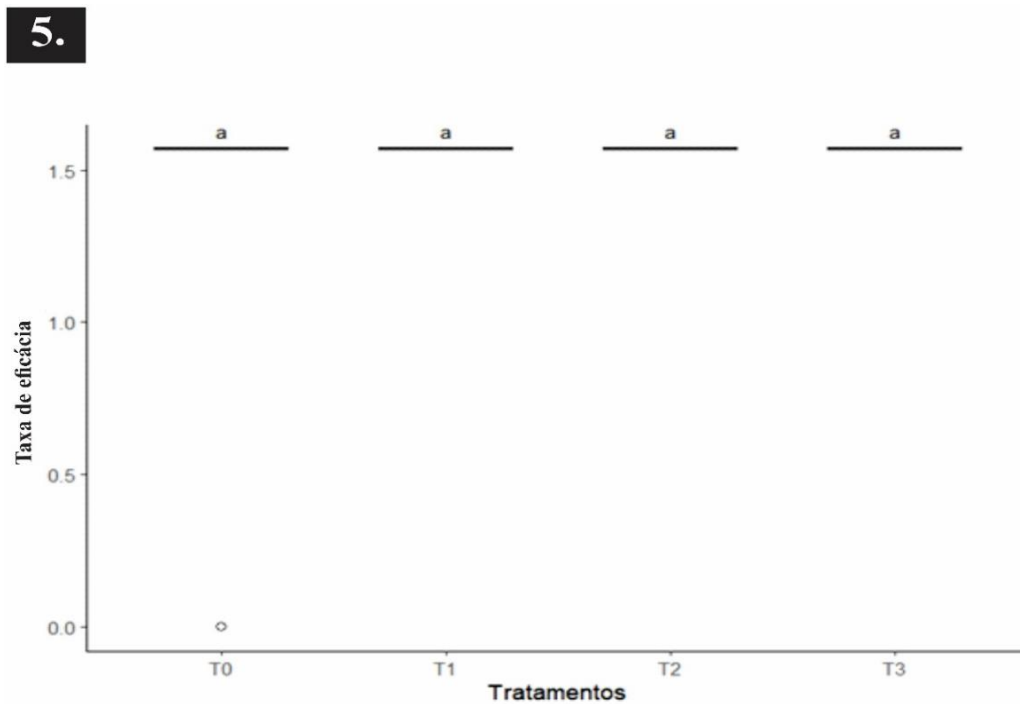


Figura. 5- Taxa eficácia dos tratamentos com explante de (A) *V. americana*, (B) *D. odorata* e (C) *B. guianensis* em diferentes condições de tratamento. T0 (meio autoclavado), T1 (meio com PPM[®] 2,0 mL mL⁻¹ autoclavado) T2 (meio com PPM[®] 2,0 mL mL⁻¹ sem autoclavar) T3 (meio com Dioxiplus[®] 3 mL g L⁻¹ sem autoclavar).

O teste de kruskall demonstra que os dados não foram significativos, pois o valor de 0.3916 é maior que 0,05 justamente pelos tratamentos não se diferenciaram entre si, mesmo o tratamento testemunha (T0) que não continha nenhum biocida.

DISCURSSÃO

O PPM[®] foi mais eficaz nas concentrações de 1,5 mL L⁻¹ e 2 mL L⁻¹, sua eficácia diminuiu proporcionalmente em níveis inferiores há essas concentrações. No entanto, mesmo no nível mais baixo, houve algum controle da formação de contaminação. É usualmente recomendado para o uso no estabelecimento da cultura nas fases iniciais, para função de verificar e ou minimizar os contaminantes microbianos endógenos (ROMADANOVA et al., 2022).

O PPM[®] é prescrito pelo fabricante como não fitotóxico quando usado em 0,5 mL L⁻¹ a 1,0 mL L⁻¹, porém neste estudo a concentração de 2,0 mL L⁻¹ não se mostrou tóxica ao explante, devido não apresentar problemas nas estruturas dos explantes. Dessa maneira, os tratamentos com os menores valores de contaminação foram aqueles em que o meio foi implementado com a maior concentração 2,0 mL L⁻¹ de PPM[®], com resultados similares obtidos com 1,5 mL L⁻¹ de PPM[®].

Mostrou-se como um adequado agente de controle de contaminação nas contaminações de baixo nível, transmissões feitas por meio do ar, pela água e contaminantes microbianos endógenos do explante, sendo um produto não termossensível é possível ser autoclavado, tornando sua utilidade no campo de cultura de tecidos vegetais viáveis. Para materiais derivados de estufa e campo Niedz e Bausher (2002) recomendam a concentração 5,0 mL L⁻¹ de PPM[®] no meio de cultura, no entanto a adição de PPM[®] desse trabalho segue em uma concentração mais alta do que as testadas nos experimentos, porém os resultados em uma concentração de 1,5 mL L⁻¹ e 2 mL L⁻¹ também se mostraram eficientes no controle de contaminação.

HO et al (2022) concluíram o importante papel do PPM[®] para limitar a contaminação do meio de cultura de grupo de acácia quando utilizado na concentração (2,0 mL L⁻¹ PPM[®]), concentração no qual apresentou boa performance no controle da contaminação. Este estudo mostrou que o PPM[®] pode ser um agente eficaz no controle da contaminação no sistema de micropropagação de *Dipteryx odorata*; *Vouacapoua americana* e *Bagassa guianensis*, quando adicionado ao meio de cultura e autoclavado. As concentrações 1,5 e 2 mL L⁻¹ PPM[®] adicionadas ao meio de cultura foram consideradas ideais para controlar a contaminação sem causar uma redução na eficácia do sistema de cultura.

Já no trabalho de Ledo (2020) avaliou diferentes procedimentos de esterilização química, por imersão com e sem o biocida PPM[®] na contaminação *in vitro* de dois genótipos de *Miscanthussinensis* uma espécie de gramínea, assim sendo prescrito como um agente eficiente na prevenção da contaminação bacteriana em cultivos *in vitro*. No entanto, o resultado obtido neste trabalho correlaciona a efetividade do PPM[®] apesar das diferentes espécies trabalhadas entre ambos.

Esses estudos demonstraram o efeito positivo do PPM[®] no controle da contaminação e destacam a importância do uso do PPM[®] em concentrações adequadas para dependendo da espécie vegetal, pois seu uso em concentração relativamente alta pode ter efeitos negativos sobre desenvolvimento do tecido vegetal. Conforme observado o uso da esterilização com Doxiplus[®] (NaClO) na concentração de 3 mL L⁻¹, resultou em 100% de descontaminação dos frascos, pois após 10 dias de incubação não mostrou sinais de futuras contaminações.

TIWARI et al., 2012, utilizando a esterilização química em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, pode-se observar que a concentração de 0,1% NaClO houve a esterilização de grande parte dos meios de cultura contendo plântulas de cana-de-açúcar. As plântulas obtidas com meio de cultura esterilizado quimicamente apresentaram morfologia foliar e intensidade de coloração verde semelhantes às obtidas em meio de cultura convencional apenas autoclavado. O resultado expresso por esse trabalho corrobora com os dados obtidos nas análises

A substituição do uso autoclave nos tratamentos pela esterilização química reduziu o tempo gasto na observação da autoclavagem e no uso de energia elétrica, especialmente porque a energia elétrica para autoclavagem tem custo elevado em comparação com o produto químico utilizado para esterilização, assim como no trabalho de Brondani et al. 2013.

Outro ponto prevalente neste trabalho é o custo benéfico dos químicos usados na esterilização dos meios, já que o Dioxiplus[®] é relativamente barato se comparado com outro produto similar estudado neste trabalho PPM[®] que por sua vez, o preço no mercado é alto. Nesse ponto de vista a esterilização química é um método eficaz para cultura de tecidos e tem potencial para diminuir custos e gastos de energia no cultivo de plantas *in vitro*. Argumento defendido no trabalho de Brondani et al. (2013).

5 CONCLUSÃO

Ambos os biocidas são recomendáveis para sua utilização no meio de cultura nos explantes de *V. americana*, *D. odorata* e *B. guianensis* e sementes de *B. guianensis*, porém o custo benéfico fornecido pelo Dioxiplus[®] (preço/eficiência), o torna um produto recomendado para diminuir gastos e torna a produção *in vitro* descontaminada.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. .; HERRERA, R. .; MENEZES, . M. .; LEÃO, F. .; SOUZA, O. . ÁRVORES MATRIZES DE VOUACAPOUA AMERICANA AUBL. EM PLANO DE MANEJO FLORESTAL COMUNITÁRIO. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. (15), n. 28, 2018. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/377>. Acesso em: 9 fev. 2023.
- CARDOSO, J. C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo in vitro de antúrio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 7, p. 785–788, jul. 2009.
- CARVALHO, P.E.R. Cumaru-ferro Dipteryxodorata. **Comunicado técnico Embrapa**, n. 225, 2004. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/578657>. Acesso em: 10 set 2022. ISSN 1517-5030.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, MM de A.; MEDEIROS, MJ L. Fatores inerentes à micropropagação. **Embrapa Algodão. Documentos**, 2006.
- CORADIN, LIDIO; CAMILLO, JULCÉIA; VIEIRA, IMA CÉLIA GUIMARÃES (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte**. Brasília, DF: MMA, 2022. (Série Biodiversidade; 53). 1452p. Disponível em: Acesso em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/livro-especies-nativas-da-flora-brasileira-de-valor-economico-atual-ou-potencial-2013-plantas-para-o-futuro-2013-regiao-norte.pdf/view>. 25 jan 2023.
- SOUZA COCCORESE CONCEIÇÃO, I.; PORTELA CARMO, L.; LIMA-BRITO, A. Costreductionin the micropropagation of Solanum lycopersicumL. var.cerasiforme. **COLLOQUIUM AGRARIAE**, v. 17, n. 3, p. 12–20, 27 maio 2021.
- DA SILVA LEDO, A. et al. Sterilization procedures and Plant PreservativeMixtureon in vitro establishment ofMiscanthussinensis Andersson. **Plant Cell Culture &Micropropagation**, v. 15, n. 2, p. 27–32, 2020.
- DE FREITAS, R. M. O. et al. EFEITO DOS TRATAMENTOS DE OXIDAÇÃO EM Aloysia virgata EFFECT OF THE OXIDATION TREATMENTS IN Aloysia virgata. p. 176–179, 2009.
- EBLING BRONDANI, G. et al.Chemical sterilizationofculturemedium: a lowcostalternativeto in vitro establishment of plants. Esterilização química do meio de cultura: uma alternativa de baixo custo para o estabelecimento in vitro de plantas. **Sci. For.**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 257-264, jun. 2013.

FRANCO, DAIANA P. ET AL. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova** [online]. 2021, v. 44, n. 2 p. 180-197. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170654> . Acessado 10 jan. 2023. ISSN 1678-7064.

GIL, M. I. et al. Fresh-cut products sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 37–45, 31 ago. 2009.

HUSSAIN, A. et al. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Em: **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. [s.l.] InTech, 2012.

HUSSAIN A; QARSHI IA; NAZIR H; ULLAH I. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: Leva A, Rinaldi MR, editors. **Recent advances in plant in vitro culture**. Croatia: InTech; 2012. p. 1–28.

HO, W. J. et al. Effective in vitro culture using dormant bud of nodal sections from a mature Acacia tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n. 3, p. 437–446, 1 jun. 2022.

KUSHNARENKO, S. et al. Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n. 6, p. 964–971, 1 dez. 2022.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 2, p. 133–138, mar. 2001.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Washington, v. 30, p. 327-421, 1981.

LUNGHUSEN, J. An effective biocide for plant tissue culture. **Aust. Hortic**, v. 96, p. 46–48, 1998.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 5, p. 468–471, 2002.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.128, n.3, p.487–508, 2017.

PEREIRA, J. E. (ed.). Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. 2. ed. Brasília, DF : **Embrapa**, 2012. E-book.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 3, p. 242–257, 15 jun. 2019.

RIBEIRO JM, TEIXEIRA SL, BASTOS. Cultivo in vitro de Sequoia sempervirens L. em meio de nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciênc. Florest.** v. 21, p. 77-82, 2011.

ROMADANOVA, N. V. et al. Effect of Plant Preservative Mixture TM on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown Apple Shoots. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2624, 5 out. 2022.

ŞEKER, M. G. et al. A Hidden Plant Growth Promoting Bacterium Isolated from In Vitro Cultures of Fraser Photinia (*Photinia × fraseri*). **INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY**, v. 19, n. 6, p. 1511-1519, 2017.

STASI, L.C. et al. Fabales medicinais. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, p.276-320, 2002

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 131–136, 30 mar. 2005.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.

TEIXEIRA SL, RIBEIRO JM, TEIXEIRA MT. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro de *Eucalyptus pellita* L. **Ciênc. Florest.** v. 18, p. 185-191, 2008

TIWARI, A. K. et al. Screening of Some Chemical Disinfectants for Media Sterilization During In Vitro Micropropagation of Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 14, n. 4, p. 364–369, 12 dez. 2012.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: **Embrapa Florestas**, p. 54 p, 2006.