

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE *PAULLINIA MELIIFOLIA***Thiago da Silva MESSIAS^{1*}; Rodrigo Kelson Silva REZENDE¹; Luciely Faustino da SILVA¹; Geisianny Pereira NUNES¹; MSc. Maílson Vieira JESUS¹**

1. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - Mato Grosso do Sul, Brasil.

*Autor Correspondente: thiagom896@gmail.com

Recebido em: 02 de setembro de 2018 – **Aceito em:** 24 de junho de 2019

RESUMO: *Paullinia meliifolia* conhecida popularmente como “pananá”, se caracteriza por apresentar hábito trepador além de ser lenhosa, latescente, com gavinhas e estípulas, monóica e apresenta caule subcilíndrico, estriado ou costado, em corte transversal com um cilindro central único ou composto por um cilindro central e 1-5 cilindros periféricos. As espécies do gênero *Paullinia* são utilizadas na medicina popular por suas propriedades antipiréticas, antinevrálgicas e anti-diarréicas, e como analgésico similar à aspirina. A micropropagação vem sendo usada com sucesso na conservação de germoplasma e propagação clonal e massal de diversas espécies florestais. Neste aspecto, um grande desafio a ser superado é no estabelecimento *in vitro*, uma vez que para o cultivo é necessária obtenção de tecidos livres de contaminações provocadas por microorganismos. Uma das etapas mais importantes na micropropagação é a desinfestação superficial do material vegetal a ser utilizado, tal procedimento pode ser realizado utilizando álcool 70 % (v/v) e hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, além de outros produtos desde que não prejudique o material a ser regenerado. A concentração da solução desinfetante e o tempo de exposição influencia significativamente no índice de contaminação *in vitro*, tornando-se necessário o estabelecimento de um protocolo eficiente para cada espécie. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de descontaminação de explantes foliares de pananá. Foram testadas três concentrações de hipoclorito de sódio em diferentes períodos de tempo (1,0% nos tempos 27; 30 e 33 minutos; 1,5% nos tempos 19, 21 e 24 minutos e 2,5% nos tempos 10; 13 e 16 minutos) combinada com álcool 70% (v/v) com tempo de exposição de 2 minutos. Como resultados, observou-se que as concentrações assim como o tempo de exposição do hipoclorito de sódio se diferenciam entre si em relação ao índice de contaminação fúngica ao nível de 1% de probabilidade de erro. Ao utilizar cloro ativo a 1,0% com tempo de exposição de 33 minutos foi obtido 95,6% de explantes livres de contaminação. Podemos concluir que a concentração (1,0%) e o tempo de exposição (33 minutos) da solução desinfetante influenciam significativamente na descontaminação do material vegetal para estabelecimento *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura *in vitro*. Descontaminação de explantes. Hipoclorito de sódio. Pananá.**INTRODUÇÃO**

A família Sapindaceae Juss pertence à ordem Sapindales (CHASE, 2016) e corresponde a aproximadamente 147 gêneros e cerca de 1.900 espécies com distribuição cosmopolita, sendo a maioria encontrada em zonas tropicais e subtropicais com poucas ocorrências em países temperados (ACEVEDO-RODRÍGUEZ et al., 2017). No Brasil ocorrem 28 gêneros e 418 espécies, sendo 190 endêmicas, ocupando variados habitats com maior diversidade na Amazônia e na Mata Atlântica (SOMNER et al., 2016). O gênero *Paullinia* se destaca nesta família devido ao seu grande número de espécies (190) (ACEVEDO-RODRÍGUEZ et al., 2010), as quais muitas são de importância econômica devido aos produtos de

metabólitos secundários como alcaloides e saponinas e outras substâncias que conferem às plantas efeitos ictio-tóxicos, além do uso em remédios, bebidas, material de construção, artesanatos, alimentação e substâncias tóxicas (GUARIM NETO, 2000).

A *Paullinia meliifolia* é conhecida popularmente como “pananá” e é utilizada na medicina popular por suas propriedades antinevrálgicas, antipiréticas e anti-diarréicas, e como analgésico semelhante à aspirina. As plantas desta espécie são lenhosas, com gavinhas e estípulas, monóicas, latescentes, com caules subcilíndricos, estriados ou costados, em corte transversal com um cilindro central único ou composto por um cilindro central e 1-5 cilindros periféricos. (SOMNER, 2001). A espécie *Paullinia meliifolia* é pouco

estudada, o cultivo *in vitro* pode ajudar na identificação e caracterização de metabólitos secundários além do rápido aumento de indivíduos idênticos à planta matriz com qualidade fitossanitária e a possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade. Esta técnica consiste no cultivo de pequenos fragmentos de tecido vegetal (explantos) em meio nutritivo adequado e sob condições controladas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo em condições assépticas (ALMEIDA et al., 2015).

Um dos desafios no estabelecimento *in vitro* é a obtenção de material vegetal livre de contaminantes por microorganismos, para isto é necessário a realização da desinfestação superficial do tecido vegetal a ser usado no cultivo, evitando, perdas do material vegetativo e do meio de cultura (RODRIGUES et al., 2003). Os microorganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes e vitaminas do meio de cultura, além de secretarem metabólitos fitotóxicos no meio como os ácidos láctico e acético e o cianeto, provocando a morte das células vegetais (LIMA; MORAES, 2006). O índice de contaminação é maior quando o material vegetativo utilizado é oriundo de plantas matrizes localizadas em campo, no entanto, mesmo quando as plantas matrizes são cultivadas em casa de vegetação, submetidas a rigoroso controle fitossanitário, estas também apresentam elevados níveis de contaminação por microorganismos. A desinfestação consiste em eliminar os microorganismos presentes na superfície do tecido vegetal, preservando o mesmo (RAZDAN, 2003).

Na descontaminação várias substâncias podem ser usadas como álcool 70% (v/v) e as substâncias germicidas à base de cloro sendo a mais comum o hipoclorito de sódio presente na água sanitária. O mecanismo de ação do cloro ativo não é bem conhecido, porém, algumas hipóteses dizem que o mesmo se associa as proteínas presentes na membrana celular dos microorganismos o que leva à inibição de

algumas enzimas essenciais, provocando, assim, a morte dos agentes infestantes (DOMINI et al., 2005). A concentração do agente desinfetante e o tempo de exposição podem influenciar no índice de contaminação *in vitro*, tornando-se necessário o estabelecimento de um protocolo eficiente para cada espécie (MORAES et al., 2007). Objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente de desinfestação superficial de explantes foliares de pananá utilizando álcool 70% (v/v) e com diferentes concentrações e tempos de exposição do material vegetal ao hipoclorito de sódio.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia e Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD.

Ramos vegetativos jovens de *Paullinia meliifolia* foram coletados de plantas matrizes com aproximadamente 1 ano de idade, localizadas no assentamento Lagoa Grande, distrito de Itahum, município de Dourados, entre as coordenadas S 21° 59' 41,8" e W 55° 19' 24,9". Após a coleta, os ramos foram levados para o laboratório onde foram deixados em água corrente por 24 horas, para remoção de impurezas. As folhas foram excisadas dos ramos e a assepsia foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal, para isso foi utilizado álcool 70% (v/v) (2 minutos) e diferentes concentrações de hipoclorito de sódio com tempos de exposição distintos (1,0% nos tempos 27; 30 e 33 minutos; 1,5% nos tempos 19; 21 e 24 minutos e 2,5% nos tempos 10; 13 e 16 minutos) seguido de 3 lavagens com água destilada e autoclavada.

Após a descontaminação foram obtidos explantes foliares com aproximadamente 1 cm² mantendo-se a nervura central. Os explantes foram inoculados com a porção abaxial em contato com meio de cultura, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS

(MURASHIGE; SKOOG, 1962), solidificado com $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave, à temperatura de 121°C e à pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$, durante 20 minutos.

Após a inoculação, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias no escuro, sendo posteriormente mantido sob fotoperíodo de 16 horas ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas. Após 20 dias da instalação do experimento, avaliou-se a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana assim como a porcentagem de explantes necrosados (oxidados).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso. O experimento constituiu-se de 9 tratamentos com 5 repetições cada, sendo cada repetição composta de 5 tubos de ensaio com um explante cada. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste Tukey, ao nível de 1% de probabilidade de erro. A análise dos dados foi realizada com o software GENES (CRUZ, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos (tabela 01) verifica-se que não houve necrose dos explantes foliares de *Paullinia meliifolia* em nenhum dos tratamentos, assim como não houve contaminação bacteriana mostrando que o álcool 70% (v/v) com tempo de exposição de 2 minutos é eficiente para descontaminação do tecido vegetal contaminado por bactérias. Segundo Yosef et al. (2000) o álcool possui atividade contra bactérias na forma vegetativa, o que se caracteriza como desinfetante e anti-séptico, no entanto, sem ação esterilizante. A concentração que possui maior eficácia e rapidez microbiana é de 70% (TORTORA,

2000) o que justifica a concentração usada neste trabalho. Na tabela 01 observa-se pela análise de variância que houve diferença significativa para o teste F entre as concentrações e tempo de exposição do hipoclorito de sódio para a variável contaminação fúngica. Quando utilizado hipoclorito de sódio a 2,5% observa-se que houve grande porcentagem de contaminação fúngica chegando até a 99,6% de explantes contaminados, não houve diferença significativa entre os tempos de exposição (10, 13 e 16 minutos).

Ao realizar a desinfestação do material vegetal com hipoclorito de sódio a 1,5%, observou-se que esta concentração com um intervalo de tempo maior possui diferenças significativa das demais concentrações utilizadas (2,5 e 1,0) mostrando nível de contaminação que variou de 60,6 a 70,2%, mostrando também alto índice de contaminação fúngica. O tempo de exposição do cloro ativo a 1,5%, apresenta distinção ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F, onde ao se utilizar o agente desinfetante a 1,5% com tempo de exposição de 24 minutos se obtém a menor taxa de contaminação, comparado com os tempos de exposição de 19 (69,2%) e 21 (70,2%) minutos.

As menores taxas de contaminação se deram quando o tecido vegetal foi desinfestado com hipoclorito de sódio a 1,0% com tempos de exposição de 27, 30 e 33 minutos. O material vegetativo quando exposto por 33 minutos apresentou o menor nível de contaminação fúngica com média de 4,6% ou seja 95,4% dos explantes não foram contaminados. Este tempo de exposição se diferencia dos demais (27 e 30 minutos) ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

Tabela 1. Porcentagens de contaminação fúngica, bacteriana e necrose, sobre explantes foliares de *Paullinia meliifolia* após 20 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio com tempos de exposição distintos.

Concentração de Hipoclorito de sódio (%)	Tempo de Exposição (minutos)	Contaminação (%)		Necrose (%)
		Fúngica	Bacteriana	
2,5	10	99,6 a	0	0
2,5	13	90,9 a	0	0
2,5	16	91,6 a	0	0
1,5	19	69,2 bc	0	0
1,5	21	70,2 b	0	0
1,5	24	60,6 c	0	0
1,0	27	20,12 d	0	0
1,0	30	19,08 d	0	0
1,0	33	4,6 e **	0	0
CV (%)	-	6,5	-	-

Fonte: Os autores (2018).

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$) pelo teste F. Dourados – MS, UFGD, 2018.

O cloro ativo é muito eficaz na desinfestação de microorganismos existentes em superfícies, por esta propriedade se torna muito usado para descontaminação de materiais expostos a agentes contaminantes. Este trabalho mostra que a combinação de álcool 70% (v/v) e cloro ativo é eficiente na descontaminação de tecido vegetal de pananá, podendo apresentar até 96% de descontaminação. Diniz et al. (2008) ao realizarem a desinfestação de rizomas de lírio da paz também observaram que ao usar álcool combinado com cloro ativo obtiveram uma taxa de 73% de explantes livres de contaminação.

O percentual de 95,4% de explantes livre de contaminação encontrado neste trabalho está de acordo com outros autores como é o caso de Pereira et al. (2011) que ao utilizar 2% de cloro ativo obteve-se 100% dos explantes livres de contaminação por microorganismos. A concentração de hipoclorito de sódio pode influenciar significativamente a taxa de contaminação, assim como neste experimento Picolotto et al. (2007) fez uso de diferentes concentrações de agente desinfetante a base de cloro ativo e como resultado obteve-se apenas 2% do material comprometido, quando a concentração da substância usada era de 5%.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir pelos dados obtidos neste trabalho que a combinação entre álcool a 70% (v/v) (2 minutos) e hipoclorito de sódio a 1,0% com tempo de exposição de 33 minutos, é eficiente na desinfestação de material vegetal de *Paullinia meliifolia* contaminado por microorganismos, sem a perda dos explantes por necrose.

Sendo assim, recomenda-se que para descontaminação de explantes de *Paullinia meliifolia* se utilize concentrações baixas de cloro ativo, porém com maior tempo de exposição, igualmente o que foi realizado neste trabalho, ao desinfestar os explantes foliares de *Paullinia meliifolia* com 1,0% de cloro ativo com tempo de 33 minutos.

Fica evidente que mesmo quando se utiliza uma concentração maior do agente desinfetante a base de cloro (2,5%), no entanto, com tempo de exposição baixo, parece que o cloro ativo não consegue eliminar os agentes contaminantes, o qual necessita de maior tempo de ação.

ESTABLISHMENT OF PROTOCOL FOR DECONTAMINATION OF FOLIAR EXPLANTS OF *Paullinia Meliifolia*

ABSTRACT: *Paullinia meliifolia* popularly known as "pananá", is characterized by a climber habit, besides being woody, latscent, with tendrils and stipules, monóica and presents subcilíndrico stem, striated or lateral, in cross section with a single central cylinder or composed by a cylinder central and 1-5 peripheral cylinders. Species of the genus *Paullinia* are used in folk medicine for their antipyretic, antinegralgic and antidiarrheal properties, and as analgesic similar to aspirin. Micropropagation has been successfully used in the conservation of germplasm and the clonal and mass propagation of several forest species. In this aspect, a great challenge to be overcome is in the establishment *in vitro*, since for the cultivation it is necessary to obtain tissues free of contaminations caused by microorganisms. One of the most important steps in micropropagation is the superficial disinfection of the plant material to be used, such a procedure can be carried out using 70% (v / v) alcohol and sodium hypochlorite in different concentrations, in addition to other products as long as it does not damage the material to be regenerated. The concentration of the disinfectant solution and the time of exposure significantly influence the *in vitro* contamination index, making it necessary to establish an efficient protocol for each species. This work aimed to establish an efficient protocol for decontamination of pananá leaf explants. Three concentrations of sodium hypochlorite were tested at different time periods (1.0% at 27, 30 and 33 minutes, 1.5% at 19, 21 and 24 minutes and 2.5% at 10, 13 and 16 minutes) combined with 70% alcohol (v / v) with exposure time of 2 minutes. As results, it was observed that the concentrations as well as the exposure time of sodium hypochlorite differ from each other in relation to the fungal contamination index at the 1% error probability level. When using active chlorine at 1.0% with exposure time of 33 minutes, 95.6% of free explants were obtained from contamination. We can conclude that the concentration (1.0%) and the exposure time (33 minutes) of the disinfectant solution significantly influence the decontamination of the plant material for *in vitro* establishment.

KEYWORDS: *In vitro* culture. Explosive Decontamination. Sodium Hypochlorite. Pananá.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; WURDACK, K. J.; FERRUCCI, M. S.; JOHNSON, G.; DIAS, P.; COELHO, R. G.; STRONG, M. T. Generic relationships and classification of tribe Paullinieae (Sapindaceae) with a new concept of supertribe Paullinioidae. **Systematic Botany**, 2017, 42.1: 96-114.

ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; VAN WELZEN, P. C.; ADEMA, F.; VAN DER HAM, R. W. J. M. Sapindaceae. In: **Flowering Plants**. Eudicots. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 357-407.

ALMEIDA, N. M.; GONÇALVES, H. A.; ROCHA, S. Produção de mudas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em larga escala: uma inovação tecnológica. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 16.; Congresso Latino-Americano e Caribenho de Mandioca, 2015, Foz do Iguaçu. Integração: segurança alimentar e geração de renda: **Anais**. Foz do Iguaçu: SBM, 2015. 1 CD-ROM.

CHASE, M. W. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2016, 181.1: 1-20.

CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. v.38, n.4, p.547-552, 2016

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; DE OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, 2008, 39.1.

DOMINI, L. P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A. P.; SOUZA, J. A.; VIÉGAS, J.; Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes Concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517–522, 2005.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (Musa aaa cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 181-186, 2006.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento in vitro de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 39-44, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, 1962, 15.3: 473-497.

GUARIM NETO, G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta bot. bras**, 2000, 14: 327-334.

PEREIRA, G. A.; CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira'Grande Naine'em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2011, 222-226.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; DE SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia agraria**, 2007, 8.1: 19-23.

RAZDAN, M. K. Aseptic manipulation. In: RAZDAN, M. K. (Ed.) Introduction to plant tissue culture. **2 ed. Enfield**: Science, 2003. p.35-40.

RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Assepsia de sementes de bromélia imperial para cultivo *in vitro*. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., Lavras. Anais... Lavras: **ABCTP**, p. 251. 2003.

SOMNER, G. V.; FERRUCCI, M.S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; PERDIZ, R.O.; COELHO, R. L. G.; MEDEIROS, H. Sapindaceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016.

TORTORA G. J.; FUNK B. R.; CASE C. L. Controle do crescimento microbiano in: Tortora GJ, ed. Microbiologia, 6ª. Ed – Porto Alegre: **Artes Médicas Sul**, 2000; 181- 206.

YOSEF A. Alcohols, in Block, S.S., **Disinfection, Sterilization, and Preservation, 5ed.** – 2000; 229-253.