



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E**  
**AMBIENTAIS**



**Estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* e *Annona squamosa*  
utilizando segmentos nodais**

**CRISTIANE ALMIRON BATISTA DE FREITAS**

**DOURADOS**  
**MATO GROSSO DO SUL**  
**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E**  
**AMBIENTAIS**



**Estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* e *Annona squamosa*  
utilizando segmentos nodais**

**CRISTIANE ALMIRON BATISTA DE FREITAS**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CLÁUDIA ROBERTA DAMIANI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral – Bioprospecção, para a obtenção do título de Mestre.

**Dourados**  
**Mato Grosso do Sul**  
**2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E  
AMBIENTAIS



**Estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* e *Annona squamosa*  
utilizando segmentos nodais**

CRISTIANE ALMIRON BATISTA DE FREITAS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de  
MESTRE EM BIOLOGIA GERAL

Aprovada em:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Roberta Damiani  
(Orientadora – UFGD)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Correa Santos  
(UFGD)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Liliam Silvia Cândido  
(UFGD)

*Aos meus amados pais,*

***Vitoriano Almiron (in memoriam) e Maria Lúcia Almiron,***

*Pela confiança, apoio, dedicação e pelo amor incondicional,  
que fez com que eu chegasse até aqui*

***OFEREÇO***

***A Deus,***

*por me dar mais essa vitória.*

***Ao meu esposo Antônio Jorge,***

***e à minha filha Poliana,***

*pelo amor, carinho, paciência,*

*compreensão e pelas palavras*

*de incentivo e coragem*

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela sua presença constante na minha caminhada, guiando e iluminado meus passos me dando coragem para chegar até aqui, Amém.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Cláudia Roberta Damiani**, pela orientação, ensinamentos, compreensão, paciência amizade, confiança em mim depositada e por toda a contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores membros da Banca Examinadora, por aceitarem fazer parte desse trabalho e contribuir com seus conhecimentos.

Ao meu esposo **Antônio Jorge** e filha **Poliana**, pela compreensão, amor, companheirismo e generosidade em repartir os momentos de nosso convívio com essa conquista.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de aprendizado.

À FUNDECT e CNPq pelo apoio financeiro e a CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudo que garantiu o sustento financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Ao **Paulo Henrique** secretário do Programa de Pós Graduação Biologia Geral/Bioprospecção, pelo profissionalismo excelente.

Aos técnicos dos Laboratórios de Botânica e Multiuso-FCBA (Marquinhos, Tati, Fabi, Mara, Livia e Jú) e Daniele Zulin pela colaboração e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Às minhas companheiras irmãs (sisters) **Thalita** e **Nayara**, pelo carinho, apoio, ajuda e amizade sincera.

Aos meus amigos queridos Nayara Fernanda, Nayara Moreno, Paulo, Vinicius, Simone, Tobias, Ana Caroline, Thalita, Mirian, Emerson e Suellen, pelo carinho, incentivo e por todos os momentos agradáveis que passamos juntos. E a todas as pessoas que colaboraram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	12
INTRODUÇÃO GERAL .....	14
REFERÊNCIAS .....	23
CAPÍTULO I: ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Annona crassiflora</i> (MART.).....	28
RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	30
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS .....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
CONCLUSÕES .....	39
REFERÊNCIAS .....	40
CAPÍTULO II: ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Annona squamosa</i> (L.) .....	43
RESUMO .....	44
ABSTRACT .....	45
INTRODUÇÃO .....	46
MATERIAL E MÉTODOS .....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
CONCLUSÕES .....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	60
REFERÊNCIAS .....	61
ANEXOS .....	64

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I: Estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* (Mart.)

**Figura 1.** Efeito do tempo de desinfestação na porcentagem de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados e no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* (Mart.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Figura 2.** Efeito de diferentes pH de cultivos no controle da contaminação fúngica, bacteriana e no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* (Mart.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2013.

### Capítulo II: Estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.)

**Figura 1.** Efeito do tempo de desinfestação na porcentagem de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados, e B) Efeito do tipo de desinfestante na porcentagem de contaminação bacteriana e oxidação e no estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Figura 2.** Efeito do tempo de desinfestação e do tipo de desinfestante no controle da contaminação fúngica dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Figura 3.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na oxidação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Figura 4.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio no controle da contaminação bacteriana dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Figura 5.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio no controle da contaminação fúngica dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013. ns: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Figura 6.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) adicionados ao hipoclorito de sódio (HS) no controle da contaminação bacteriana e fúngica dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. ns: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Figura 7.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) adicionados ao hipoclorito de sódio (HS) na oxidação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Figura 8.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (PH) adicionados ao hipoclorito de sódio (HS) na porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. ns: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.



## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1. A)** Plantas matrizes de *Annona crassiflora* (Mart.) encontradas em área de Cerrado pertencente ao 20º Regimento de Cavalaria Blindado do Exército Brasileiro, Campo Grande - Mato Grosso do Sul. **B)** Ramos vegetativos de *Annona crassiflora* (Mart.) utilizados para a retirada dos segmentos nodais durante o estabelecimento *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Anexo 2. C)** Explantes de *Annona crassiflora* (Mart.) tratados com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 2,5% . **D)** Explante de *Annona crassiflora* (Mart.) em meio de cultura WPM e pH 5,8 durante o estabelecimento, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Anexo 3. E)** Plantas matrizes de *Annona squamosa* L. em áreas de Cerrado na região de Dourados - Mato Grosso do Sul. **F)** Ramos vegetativos de *Annona squamosa* (L.) utilizados para a retirada dos segmentos nodais durante o estabelecimento *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

**Anexo 4. G)** Explantes de *Annona squamosa* (L.) tratados com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio adicionados ao hipoclorito de sódio durante o estabelecimento, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

## RESUMO

As espécies da família Annonaceae podem ser propagadas por sementes e por métodos vegetativos. Entretanto, a maioria das espécies desta família apresenta inibição da germinação, resultado da dormência imposta pela presença de substâncias inibidoras, as quais retardam o processo de germinação, que geralmente acontece de forma irregular inviabilizando a produção de mudas de forma homogênea. Uma das alternativas para sua propagação consiste na reprodução assexuada via clonagem *in vitro* ou micropropagação. O presente trabalho teve como objetivo principal estabelecer um protocolo para assepsia e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de duas espécies de anonáceas (*Annona crassiflora* Mart. e *Annona squamosa* L.), utilizando a micropropagação para a produção de mudas. O material vegetal utilizado foi obtido de ramos vegetativos jovens coletados de plantas encontradas em áreas de Cerrado da região de Campo Grande e de Dourados (Mato Grosso do Sul). Foram realizados dois experimentos com *Annona crassiflora* Mart. e três experimentos com *Annona squamosa* L.. *Experimento 1*: Efeito do tempo de exposição (10; 15 e 20 minutos) e do desinfestante (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 2,5%) no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora*; *Experimento 2*: Efeito do tipo de meio de cultura (WPM e MS) e do pH de cultivo (5,2; 5,4 e 5,8) no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora*; *Experimento 3*: Efeito do tempo de exposição (10; 15 e 20 minutos) e do desinfestante (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio à 2,5%) no estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa*; *Experimento 4*: Efeito de diferentes concentrações no tratamento com cloreto de mercúrio (0,0 - controle; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 %) no estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa*; *Experimento 5*: Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (10; 20; 30 e 40%) adicionado ao hipoclorito de sódio (2,5%) na desinfestação dos explantes no estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa*. As avaliações foram realizadas de forma sequencial aos 7; 14 e analisados aos 28 e/ou 56 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de contaminação bacteriana, porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de explantes oxidados e porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* (considerando estabelecidos aqueles que emitiram brotações). A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que, durante o estabelecimento *in vitro* de *A. crassiflora*, a desinfestação com hipoclorito de sódio apresenta maior eficiência no controle da contaminação bacteriana, enquanto que, para a

mesma variável, 15 minutos de exposição ao agente desinfestante reduz em aproximadamente 50% a contaminação dos explantes, independentemente do tipo de hipoclorito (cálcio ou sódio). Em pH de cultivo 5,8, os explantes cultivados em meio MS apresentam menor oxidação, já em pH 5,4 observou-se menor oxidação em meio WPM. Para o estabelecimento *in vitro* da *A. squamosa*, quanto maior o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, menor a contaminação fúngica, sendo o inverso observado na desinfestação com hipoclorito de cálcio. Os tratamentos com hipoclorito de sódio e cálcio não foram eficientes no controle da contaminação bacteriana e não influenciaram na oxidação dos explantes. Com relação ao uso de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na desinfestação dos explantes em *A. squamosa*, a concentração de 0,075%, foi a que apresentou maior redução da contaminação bacteriana, porém, nenhuma das concentrações testadas foram eficientes no controle da contaminação fúngica. Em *A. squamosa*, a desinfestação dos explantes com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e adicionado ao hipoclorito de sódio, bem como, o tratamento controle somente com hipoclorito de sódio, não apresentaram diferenças entre os tratamentos para as variáveis contaminação fúngica, bacteriana e oxidação dos explantes. No entanto, em todas as concentrações testadas observou-se um número elevado de explantes estabelecidos (25%).

**Palavras-chave:** Araticum, marolo, propagação vegetativa, desinfestação, micropropagação.

## ABSTRACT

The species of the Annonaceae family can be propagated by seeds and vegetative methods. However, most species of this family shows inhibition of germination, dormancy imposed by the result of the presence of inhibitors, which slow the germination process, which usually happens irregularly precluding the production of seedlings evenly. An alternative to its spread is the asexual reproduction via cloning or *in vitro* micropropagation. This study aimed to establish a protocol for disinfection and *in vitro* establishment of shoot explants of two species of Annonaceae (*Annona crassiflora* Mart. and *Annona squamosa* L.) using micropropagation as a new alternative for the production of seedlings. The plant material was obtained from young vegetative branches collected from plants found in Cerrado region of cities Campo Grande and Dourados, Mato Grosso do Sul. To achieve the proposed objectives five separate experiments were performed with both species. Experiment 1: Effect of time of exposure ( 10, 15 and 20 minutes ) and disinfect (calcium hypochlorite and sodium hypochlorite at 2.5 %) *in vitro* establishment of *Annona crassiflora*; Experiment 2: Effect of the type of medium culture (WPM and MS) and growth pH ( 5.2, 5.4 and 5.8 ) *in vitro* establishment of *Annona crassiflora*; Experiment 3: Effect of exposure time ( 10, 15 and 20 minutes ) and disinfect (calcium hypochlorite, sodium hypochlorite and 2.5 %) *in vitro* *Annona squamosa* establishment; Experiment 4: Effect of different concentrations treatment with mercuric chloride (0.0 - control; 0.025, 0.050, 0.075 and 0.100 %) *in vitro* establishment of *Annona squamosa*; Experiment 5: Effect of different concentrations of hydrogen peroxide (10, 20,30 and 40 %) is added to sodium hypochlorite (2.5 %) in the disinfection of explants *in vitro* establishment *Annona squamosa*. The evaluations were performed at 7, 14 and 28 and or 56 days, with the final evaluation computed as before. The variables analyzed were: percentage of bacterial contamination, percentage of fungal contamination, percentage of oxidized explants and percentage of explants *in vitro* established (considering its those issued shoots). From the results obtained it is concluded that during the initial *in vitro* *A.crassiflora*, the sodium hypochlorite has greater efficiency in the control of bacterial contamination while for the same variable, 15 minutes of exposure to the agent reduces disinfect at approximately 50% explant, regardless of the type of hypochlorite (calcium or sodium).The explants cultured on WPM medium with pH 5.8 have a lower percentage of fungal contamination. With pH 5.8, the culture medium MS causes less oxidation of explants. But with pH 5.4, the WPM is

more effective in controlling this variable. To establishing *in vitro* *A. squamosa* it was concluded that the longer the duration of exposure to sodium hypochlorite, more low the fungal contamination. The reverse is observed on the disinfection with calcium hypochlorite. These same treatments were not effective in controlling bacterial contamination and did not influence the oxidation of explants. Treatment with mercuric chloride at concentrations 0.075 %, there is a reduction of bacterial contamination, however, none of the concentrations was effective in controlling fungal contamination. The addition of hydrogen peroxide to sodium hypochlorite, as well as the control treatment only with sodium hypochlorite at all concentrations tested allowed to obtain a large number of established explants (25%). However, the data obtained in other variables fungal contamination and bacterial oxidation did not differ between treatments.

**Key-words:** 'Araticum', 'marolo', vegetative propagation, disinfestation, micropropagation.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1. Aspectos gerais do Cerrado**

O Cerrado é o segundo maior domínio fitogeográfico do país em termos de área, ocupando cerca de 25% do território nacional e apresentando uma grande diversidade em sua fauna e flora. Suas extensas paisagens impressionam por sua diversidade fisionômica, onde variam a predominância e o porte das espécies lenhosas, característica típica das savanas tropicais, resultante da alta diversidade de fatores biológicos e abióticos presentes em seus microhabitats (ÁVIDOS e FERREIRA, 2003).

O Cerrado contém um terço da biodiversidade do território nacional e 5% da flora mundial, sendo considerada a mais rica entre as savanas do mundo é considerado o mais rico em espécies nativas frutíferas voltadas para o aproveitamento alimentar, as quais produzem frutos comestíveis, de formas variadas, cores atrativas e sabores característicos, apresentando um grande potencial de utilização agrícola (SANO et al., 2008).

Além do desenvolvimento de pomares domésticos e comerciais, as espécies frutíferas nativas do Cerrado podem auxiliar na recuperação de áreas devastadas ou degradadas, para controle de erosão e no desenvolvimento de áreas de proteção ambiental (SILVA et al., 2001; VIEIRA et al., 2010).

O uso sustentável da flora nativa de frutíferas do Cerrado pode ser uma excelente opção para melhorar a saúde da população, devido ao alto valor nutricional dos frutos (AGOSTINI-COSTA e VIEIRA, 2004). Além disso, aumentar o potencial de exploração comercial do fruto possibilitaria melhorar a renda dos pequenos produtores rurais e contribuir para a preservação das espécies visto que a produção regional de frutíferas nativas configura-se essencialmente extrativista (AQUINO et al., 2007).

A propagação vegetativa nas regiões dos cerrados era feita por meio natural de multiplicação das espécies, havendo dúvidas quanto ao papel das sementes nesse processo. Com o passar do tempo, a observação de ocorrência natural da propagação sexuada nas plantas nativas despertando o interesse do meio científico. Essa demanda incentivou o aprimoramento das técnicas de propagação das espécies frutíferas do Cerrado e por consequência, a produção de mudas, com seleção de genótipos mais adequados (BERNARDES et al., 2007).

## 1.2. *Annona crassiflora* Mart. e *Annona squamosa* L.

A família Annonaceae é uma das maiores entre as Angiospermas basais, com aproximadamente 135 gêneros e 2.500 espécies (CHATROU et al., 2004), distribuição predominantemente tropical. Seus representantes são plantas lenhosas, de porte arbóreo ou arbustivo (SOUZA e LORENZI, 2005). No Brasil, é representada por 26 gêneros, sendo sete deles endêmicos, com cerca de 260 espécies. As espécies desta família caracterizam-se por apresentar folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano ao longo dos ramos (MAAS et al., 2001). Muitas espécies da família Annonaceae podem ser consideradas promissoras para o comércio e indústria, devido ao grande potencial no comércio de frutos e medicinal, pois apresentam vários compostos bioativos, tais como as acetogeninas, os alcalóides e os flavanóides, encontrados principalmente nas sementes, nos frutos, na casca e nas raízes de *Annona crassiflora* Mart. (CORDEIRO et al., 2005).

Dentre as espécies mais conhecidas da família Anonácea destacam-se: a ata, frutado-conde ou pinha (*Annona squamosa* L.), cherimóia (*Annona cherimolia* Mill.), graviola (*Annona muricata* L.), atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), araticum-do-campo (*Annona dioica*), araticum-do-brejo (*Annona paludosa*), cabeça-de-negro (*Annona coriacea*), Llama (*Annona diversifolia*) e araticum ou marolo (*Annona crassiflora* Mart.) (MANICA, 2003).

O araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) é uma planta arbórea nativa do Brasil e encontra-se amplamente distribuído no Cerrado, estando entre as 25 espécies mais frequentes desse bioma (RIBEIRO et al., 2000). Trata-se de uma planta que apresenta valor ornamental, madeireiro e medicinal, sendo empregada popularmente como antidiarreica (sementes) e como antimicrobiana, por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (ALMEIDA, 1998; AQUINO et al., 2007; SOARES et al., 2009). A altura varia entre 4,0 e 8,0 m e o diâmetro da copa chegando aos 4,0 m. O tronco é geralmente tortuoso, variando entre 20 e 30 cm de diâmetro, revestido por uma casca (súber) áspera e corticosa resistente à ação do fogo (LORENZI, et al., 2006). A planta floresce, geralmente, entre os meses de outubro e novembro. As flores são geralmente solitárias, mas podem ser encontradas agrupadas, com pétalas carnosas, de cor verde-amarelada e sedosas (LORENZI, 1998). Seu fruto, popularmente conhecido como marolo, araticum, araticum dos grandes ou cabeça de negro, é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada, de cor verde com

o fruto em desenvolvimento, e marrom, quando maduro (LORENZI, 1998). A sua polpa é levemente adocicada e de cheiro agradável, podendo variar do branco ao amarelo, sendo que esse último tem sabor e cheiro mais acentuado, e por isto é bem aceito pelo mercado (CARVALHO, 2002). Ainda assim, encontra-se subutilizada comercialmente e sob ameaça de extinção devido ao extrativismo predatório (PINTO et al., 2005).

A *Annona squamosa* L., espécie nativa da América central, é encontrada no mundo inteiro. No Brasil, a pinheira frutifica uma vez por ano e sua fruta é conhecida como pinha ou fruto-do-conde (MENEGAZZO et al., 2008). A pinheira típica é considerada uma árvore pequena, de até 5 metros de altura e com muitas ramificações. As folhas são decíduas, de lâminas oblongo-elípticas e ápice obtuso ou arredondado, medindo de 5,0, a 15 cm de comprimento por 2,0 a 6,0 cm de largura, sendo de coloração verde-brilhante na parte superior e de cor verde-azulada na parte inferior. Esta espécie apresenta as partes masculinas e femininas na mesma planta e na mesma flor, sendo, portanto, classificada como uma planta hermafrodita, com as flores que se originam nos pequenos ramos novos, sendo pendentes, solitárias ou em grupo de duas a quatro (MANICA, 2003).

O fruto da pinheira é um sincarpo arredondado, do tipo baga composta, ovóide, esférico ou cordiforme, e possui de 5,0 a 13 cm de diâmetro. Quando o fruto apresenta-se completamente maduro, os carpelos apresentam-se separados um dos outros, visualizando assim em seu interior a polpa branca ou amarelada. A polpa envolve isoladamente cada uma das numerosas sementes, as quais possuem coloração preta brilhante ou castanha-clara e tem a forma elíptica, medindo de 1,4 a 2,3 cm de comprimento por 0,8 a 1,2 cm de largura (HOEHNE, 1946; MANICA, 2003). O sistema radicular da pinheira é do tipo pivotante e, em plantas jovens, possui um crescimento superior à sua parte aérea.

A profundidade atingida pela raiz é em média 5,5 vezes superior à altura do caule, proporcionando à planta grande tolerância em relação às variações hídricas do solo (OLIVEIRA et al., 2005). O fruto dessa espécie possui grande potencial nutritivo e são muito apreciados devido a sua polpa de sabor adocicado, podendo ser consumido *in natura* ou sob a forma de doces. Na medicina popular, as sementes são utilizadas para combater a diarreia e induzir a menstruação (SANO e ALMEIDA 1998).

As plantas da família Annonaceae podem ser propagadas por sementes e por métodos vegetativos. (PINTO, 2005). Entretanto, as sementes dessas plantas apresentam substâncias



inibidoras de germinação, que provocam dormência (GEORGE e NISSEN, 1987; GAMA e MANICA, 1994), fazendo com que a germinação seja retardada e de forma irregular. A propagação sexuada por permitir a recombinação gênica é vantajosa no sentido de aumentar a biodiversidade e fornecer possibilidades para o melhoramento genético da espécie. No entanto, para a produção de mudas com fins comerciais, a uniformidade genética é fundamental (PINTO, 2005; MELO, 2005).

O primeiro passo para a introdução de um cultivo comercial é a determinação de técnicas adequadas de propagação, principalmente assexuada. Esta permite a clonagem de plantas selecionadas diretamente na natureza ou provenientes de hibridações dirigidas, mantendo seus caracteres desejáveis e levando a formação de mudas de alta qualidade e de pomares mais uniformes ao manejo e à colheita, resistência a doenças e outros caracteres importantes na fruticultura (PEREIRA et al., 2001). Plantas cultivadas, especialmente arbóreas, devem ser propagadas assexuadamente a fim de manter as características desejáveis encontradas na planta mãe. (MELO et al., 2000).

A propagação vegetativa é indicada para plantas que não se reproduzem bem por processos sexuais, por não transmitirem determinadas características por via hereditária, tais como a forma da planta, variantes na cor das flores ou aspectos peculiares, quantidade de sementes formadas ou poder germinativo (ALMEIDA, 2010). Existem poucas informações a respeito da produção de mudas via propagação vegetativa para família anonácea. Uma das alternativas seria a propagação por estaquia, que permite a clonagem do material e que pode ser influenciada por diversos fatores: nutrientes no meio, teores de reservas, balanço hormonal, as condições do meio ambiente, genética, entre outros (ALMEIDA, 2010).

Outro método de se propagar assexuadamente uma espécie é a micropropagação, que possibilita a produção de mudas em grande quantidade de clones de genótipos elite, saudáveis e em um curto período de tempo, sendo por isso a micropropagação considerada uma técnica mais eficiente mais vantajosa (BRUM, 2001).

### **1.3. CULTURA DE TECIDOS**

A cultura de tecidos de plantas é um termo que exprime o conceito de que uma ampla gama de tipos de tecidos de plantas pode ser cultivada, sob condições assépticas e *in*

*in vitro*, visando micropropagação, armazenamento ou limpeza clonal. A cultura de tecidos se baseia na teoria da totipotência das plantas terem a capacidade de regenerar um organismo inteiro, idêntico à matriz doadora, a partir de células únicas (SATO e YAMADA, 2008).

A cultura de tecidos é uma excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente idênticas, que podem ser multiplicadas em grande quantidade. Tal técnica pode ainda ser empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação por via sexuada, como ocorre em algumas espécies nativas do Cerrado. Outro exemplo de grande importância é a limpeza clonal, por meio da qual é possível ter uma produção de mudas livres de vírus. Essa técnica consiste em cultivar meristemas e induzir a formação de material propagativo, geneticamente idênticos aos parentais (FERREIRA et al., 1998).

Na cultura de tecidos, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado, tendo como objetivo obter nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismo, de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico do ancestral comum (TORRES et al., 2000).

Consideramos explante como todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*, podendo ser de um fragmento de folha, de raiz, de caule ou qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura. Os explantes podem regenerar órgãos vegetais ou plantas completas idênticas à planta matriz, ou ainda dar origem a massas celulares denominadas calos, que também podem regenerar plantas (por organogênese indireta), porém, neste caso são sistemas mais indicados à produção de substâncias *in vitro* (TORRES et al., 2000). A utilização mais disseminada da cultura de tecidos vegetais é a clonagem *in vitro* ou micropropagação. É o único recurso da cultura de tecidos vegetais que tem documentado de forma efetiva a possibilidade de se produzir espécies de interesse em larga escala, permitindo a manutenção de coleções ativas ou de base de germoplasma vegetal (HIREGOUDAR et al., 2005).

O sucesso da regeneração *in vitro* depende do controle da morfogênese, que é influenciada por diversos fatores, tais como o tipo e a idade do explante, o genótipo, o estado fisiológico da planta matriz, os componentes do meio de cultura, os reguladores de crescimento e as condições físicas da cultura. A interação entre todos estes fatores leva à indução e expressão de um modo específico de diferenciação e desenvolvimento celular (GAJ, 2004; GIRI et al., 2004).

### 1.3.1. MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação é considerada um método rápido e eficiente, para a multiplicação de plantas selecionadas, podendo-se destacar como vantagens, a possibilidade de propagar rapidamente e em larga escala; obtenção de plantas livres de patógenos, geneticamente uniformes, viabilizando a produção vegetal quando há dificuldades nos mecanismos naturais de reprodução, ou nos casos de espécies ameaçadas de extinção (DUTRA et al., 2009). A micropropagação de plantas através da cultura de tecidos pode ser operacionalizada em uma sequência laboratorial de três estágios, cada qual apresentando objetivos, pressuposições e necessidades específicas em termos de composição dos meios de cultura, tipo e balanço dos reguladores de crescimento e condições físicas como luz, temperatura e foto período. Em condições laboratoriais cada estágio deve ser identificado e as condições ótimas devem ser estabelecidas (MURASHIGE, 1974). Debergh e Read (1991) propuseram a inclusão do estágio zero nesta sequência de operações e, desta maneira, a indução e a expressão de respostas organogênicas *in vitro* devem obedecer os seguintes passos :

Estágio 0 - Consiste em selecionar e cultivar a planta matriz doadora de explantes em condições adequadas e, eventualmente, controladas.

Estágio I - Consiste no estabelecimento da cultura asséptica. O objetivo deste estágio é a definição do tipo de explantes a ser utilizado, o estabelecimento de culturas isentas de microorganismos contaminantes, a obtenção de altos índices de sobrevivência e de rápido crescimento dos explantes. Neste estágio torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação que ocorrem: a) pela oxidação de compostos fenólicos presentes no explante, como resposta ao ferimento provocado pela excisão de um órgão ou tecido e; b)

pela síntese de compostos mono e poliméricos por parte do explante. A incubação destas culturas na ausência da luz por alguns dias pode inibir os processos oxidativos.

Estágio II - Multiplicação: este estágio é fundamentado na divisão e diferenciação celular, objetivando a obtenção de uma plântula, de acordo com as diferentes rotas morfogenéticas possíveis. De maneira geral procura-se promover a liberação de gemas axilares pré-formadas ou a indução de gemas adventícias utilizando-se da adição de citocininas no meio de cultivo. Em muitos casos estágios intermediários de calo estão envolvidos, contudo, quando o objetivo é a manutenção da conformidade clonal, a passagem por estágios de calo deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais. Neste estágio deve-se determinar o número e intervalo de sub-cultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inóculo nos sub-cultivos.

Estágio III - Nesta fase busca-se o alongamento, a indução e iniciação radicular e a preparação para a aclimatização. O objetivo deste estágio é a preparação para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas. As estratégias deste estágio incluem eventuais inclusões no meio de cultura de giberelinas para induzir o alongamento de eixos caulinares; auxinas para induzir a iniciação radicular e carvão ativado para favorecer a iniciação radicular. A redução nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatização.

Estágio IV - Aclimatização: neste estágio ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta. O emprego de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas tem reduzida capacidade de formação cutículas cerosas protetoras.

A obtenção de mudas por micropropagação depende do sucesso na fase de estabelecimento *in vitro*. Em espécies lenhosas, como a maioria das espécies frutíferas, de acordo com Schuch e Erig (2005), o estabelecimento *in vitro* apresenta três problemas principais: a contaminação e a oxidação. Outro fator agravante está na origem do material utilizado como matriz para o estabelecimento *in vitro*. Por não existir plantas matrizes

cultivadas em ambientes protegidos ou em condições controladas, os ramos vegetativos para o estabelecimento *in vitro* tem sido obtidos diretamente de plantas oriundas do campo. O uso de ramos vegetativos de plantas provenientes do campo como fonte de explantes, geralmente resulta em maior grau de contaminação e em um baixo percentual de sobrevivência. O elevado grau de contaminação e a localização sistêmica de microrganismos são responsáveis, em alguns casos, pelo insucesso da implantação de culturas *in vitro*, prejudicando inclusive a condução de experimentos em função do reduzido número de explantes obtidos (PASQUAL, 2001).

### **1.3.2. CONTAMINAÇÃO *IN VITRO***

Um grande problema enfrentado na cultura de tecidos vegetais é a contaminação *in vitro*, que resulta em perdas significativas na formação de novos clones (CASSELLS, 2001). Pelo fato das plantas selecionadas para o estabelecimento *in vitro* normalmente estarem em condições de campo, elas estão sujeitas a todo tipo de adversidades ambientais e de ataque de pragas ou microrganismos. A condição de sanidade de uma planta matriz é de grande importância, pois determinará a facilidade em descontaminar o explante durante o seu isolamento. Mesmo após a realização da desinfestação dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena permanecem no material (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A cultura de tecidos vegetais é realizada com rigorosa assepsia, principalmente devido ao fato de que, uma parte dos microrganismos, ao entrar em contato com o meio de cultura encontrará as condições necessárias para se desenvolver, competindo com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura. Existem três formas básicas de contaminação por microrganismos; meio de cultura, explante e o ambiente (PASQUAL, 2001).

Fungos, leveduras e algumas bactérias representam um risco para a cultura de tecidos de plantas, pois, são contaminantes que crescem bem nos meios de cultura para tecidos vegetais e podem afetar não somente o desenvolvimento do material *in vitro*, bem como, levar os explantes a morte. Dentre das alterações causadas pelos microrganismos pode citar a redução do pH do meio, a produção de metabólitos tóxicos e a competição por nutrientes. Tendo em vista o tempo e investimentos empregados na obtenção de explantes, bem como a dificuldade na identificação de matrizes superiores, é de fundamental

importância a elaboração de protocolos que visam reduzir o índice de contaminação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

### 1.3.3. OXIDAÇÃO FENÓLICA

A oxidação fenólica é um dos principais fatores dificultantes para o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*. A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (OLIVEIRA et al., 2001). A oxidação é resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (VAN WINKLE et al., 2003). Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, modifica a composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, a produção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000), produzindo substâncias tóxicas que normalmente inibem o crescimento dos explantes, podendo causar sua morte (SATO et al., 2001).

Com a finalidade de minimizar os efeitos negativos da oxidação fenólica durante o cultivo *in vitro*, pode-se utilizar antioxidantes ao meio de cultura (VAN WINKLE et al., 2003), como exemplo o ácido ascórbico, considerado um antioxidante biológico, normalmente encontrado em altas concentrações em muitos compartimentos celulares, como o estroma dos cloroplastos (LARSON, 1988).

Baseando-se na necessidade do desenvolvimento de mudas e de métodos alternativos à propagação sexuada, o presente trabalho teve como objetivo principal estabelecer um protocolo para assepsia e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de duas espécies de anonáceas (*Annona crassiflora* Mart. e *Annona squamosa* L.), utilizando a micropropagação para a produção de mudas.

Como objetivo específico, procurou-se estabelecer um protocolo efetivo de esterilização superficial dos explantes visando à redução da contaminação fúngica e bacteriana durante o estabelecimento *in vitro* de espécies *Annona crassiflora* Mart. e *Annona squamosa* L.).

#### 1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L.T. Frutos dos Cerrados - Preservação gera muitos frutos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.15, p.36-41, 2003.

AGOSTINI-COSTA, T.; VIEIRA, R.F. **Frutas nativas do Cerrado: qualidade nutricional e sabor peculiar**, 2004. Acessado em 7 de outubro de 2013. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br>.

ALMEIDA, S.P. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188p.

ALMEIDA, L. F. P. de; ALENCAR, C. M. de; YAMANISHI, O. K. Propagação por enxertia de atemóia „Thompson“ sobre espécies de Rollinia. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** - SP, v. 32, n. 2, p. 653-656, Junho 2010.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodouon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

AQUINO, F. de G.; AGUIAR, L. M. de S. **Caracterização e Conservação da Biodiversidade do Bioma Cerrado**. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação para o Cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 83 p, 2007.

BERNARDES, T.G.; ESTRELA, C.T.; NAVES, R.V.; REZENDE, C.F.A.; MESQUITA, M.A.M.; PIRES, L. L. Efeito do Armazenamento e de Fitohormônios na Qualidade Fisiológica de Sementes de Araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.3, p.163-168, 2007.

BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’**. 2001. 41p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2001.

CARVALHO, J. A. **Araticum: o doce aroma do cerrado**. Minas Gerais: Gráfica Editora Folha Machadense, 20p., 2002.

CASSELS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol.64, p.145-157, 2001.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonacea (Soursop family). In: Smith, N. et al. (eds). **Flowering Plants of Neotropics**. New York Botanical Garden, p. 18-20, 2004.

CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C.Q.; ANDRADE, S.M.R. Uses *Annonas* species. In: PINTO, A.C.Q. **Annona species**. Southampton: International Centre for Underutilised Crops; University of Southampton, 2005, p.41-47.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: **Micropropagation Technology and Application**. Debergh, P.C. & Zimmermann, R.H. (eds.). pp. 3-13. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers., 1991.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

FERREIRA, M.A.; CALDAS L.S.; PEREIRA E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v.1, p. 21-43, 1998.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, 2004,vol.43, p.27-47.

GAMA, F.; MANICA, I. Propagação. In: MANICA, I. **Cultivo das Anonáceas: Ata, Cherimólia, Graviola**. Porto Alegre: EVANGRAF, 1994. p. 30-37.

GEORGE, A.P.; NISSEN, R.J. Propagation of *Annona* species: a review. **Scientia Horticulturae**, 1987, v. 33, p.75-85.



GIRI, C.C; SHYAMKUMAR, B; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, 2004, v.18, p.115-135.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998, v.1, p.43-76.

HIREGOUDAR, L.V.; ASHOK KUMAR, H.G.; MURTHY, H.N. *In vitro* culture of *Feronia limonia* (L.) swingle from hypocotyl and internodal explants. **Biologia Plantarum**, 2005, v.49, n.1, p.41-45.

HOEHNE, F.C. Frutas Indígenas. Instituto de Botânica. **Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio**. São Paulo, 1946, 88 p. Publicação da Série "D".

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phyto-chemistry**, v. 27, n.4, p.969-978, 1988.

LORENZI, H. 1998. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed, Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 352p.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640p.

MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.; JUNIKKA, L.; SILVA, R.M.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 52, n.80, p. 65-98, 2001.

MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. In: **Frutas anonáceas: ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p.23-64.

MELO, D.L.B. **Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart.** 2005. 51f. Dissertação (Mestrado – Manejo Ambiental) – Universidade Federal de Lavras.

MELO, J. T. de; SALVIANO, A.; SILVA, J. A. da. Produção de mudas e plantio de araticum. (Recomendações técnicas nº 21). Planaltina: EMBRAPA- CPAC, 2000. p.2.

MENEGAZZO, M.L.; KULCZYNSKI, S.M.; SILVA, E.A.; MORAIS, M.D.; ROSSI, R.F.; OLIVEIRA, A.C. **Efeitos de métodos de superação na qualidade fisiológica de sementes de pinha (*Annona squamosa* L.)** Anais do 20º Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém, Brasil, 2008.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, 25:135-66, 1974.

OLIVEIRA, R.P. de; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraploide (Grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.73- 78, 2001.

OLIVEIRA, Z.P.; QUEIROZ, M.F.; BARROS, P.G.; CAMPOS, R.S.; LEMOS, E.E.P.; SILVA NETO, J.P. **Recomendações técnicas para a cultura da pinha**. Maceió: SEAGRI-AL, 56p. 2005.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações; meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.

PEREIRA, A.V.; PEREIRA, E.B.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. Propagação e domesticação de plantas nativas do cerrado com potencial econômico. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 19, n.2, 2001.

PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; FERREIRA, F.R.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ALVES, R.E.; KIMPARA, D.J. **Fruits for the future 5: *Annona* species**. Southhampton: IPGRI, 2005. 263p.

RIBEIRO, J.F.; BRITO, M.A. de; JÚNIOR, E.J.S.; FONSECA, C.E.L da. **Araticum**. Jaboticabal-SP: Editora: Afiliada, 2000. 52 p. (Série: Frutas Nativas).

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Orgs.). **Cerrado: Ecologia e Flora**. 1ª ed, Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 2. 406 p, 2008.

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA CPAC, 1998, 556p. ABRAMOVAY, R. Preservar para lucrar com os cerrados.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SATO, F.; YAMADA, Y. Engineering Formation of Medicinal Compounds in Cell Cultures. In: BOHNERT, H.J.; NGUYEN, H.; LEWIS, N.G. (Eds.) **Advances in Plant Biochemistry Molecular Biology**, v. 1, p. 311-345, 2008.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178 p.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; SANTANA, J. R. F. **Marolo: fruteira nativa do cerrado**. Lavras: Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2009. Boletim técnico nº 82, 17p.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática: **Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa, São Paulo.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. T.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Ed. Embrapa, 2000, 128p.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v.21, p.1175-1182, 2003.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. 1ª Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, 322 p.

## **CAPÍTULO I**

### **ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Annona crassiflora* Mart.**

## ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Annona crassiflora* Mart.

FREITAS, CRISTIANE ALMIRON BATISTA<sup>1</sup>; DAMIANI, CLÁUDIA ROBERTA<sup>2</sup>

### RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo obter um protocolo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares da *Annona crassiflora* Mart. como forma alternativa de propagação desta espécie. O material vegetal utilizado foi obtido de ramos vegetativos jovens coletado de plantas encontradas em áreas de Cerrado da região de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Para atingir os objetivos propostos foram realizados dois experimentos. *Experimento 1*: Efeito do tempo de exposição (10; 15 e 20 minutos) e do desinfestante (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio à 2,5%); *Experimento 2*: Efeito do tipo de meio de cultura (WPM e MS) e do pH de cultivo (5,2; 5,4 e 5,8). O delineamento foi inteiramente casualizado em 4 repetições, sendo cada uma delas constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada. As avaliações foram realizadas aos 7; 14 e aos 28 e/ou 56 dias, sendo uma avaliação sequencial e os dados obtidos são somados e analisados ao final. As variáveis analisadas foram: porcentagem de contaminação bacteriana, porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de explantes oxidados e porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* (considerando estabelecidos aqueles que emitiram brotações). A partir dos resultados obtidos concluiu-se que, durante o estabelecimento *in vitro* de *A. crassiflora*, o hipoclorito de sódio apresentou maior eficiência no controle da contaminação bacteriana, sendo que 15 minutos de exposição reduz em aproximadamente 50% a contaminação dos explantes, independentemente do tipo de hipoclorito (cálcio ou sódio). O meio MS com pH 5,8 causou menos oxidação de explantes, mas o meio WPM com pH 5,4 mostrou-se mais eficaz no controle desta variável.

**Palavras-chave:** marolo, micropropagação, cultura de tecidos.

---

<sup>1</sup>Bióloga, Mestranda em Biologia Geral-Bioprospecção, Bolsista CAPES, FCBA/UFGD, e-mail: [crisabf@yahoo.com.br](mailto:crisabf@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Bióloga, Dra., Prof<sup>o</sup>. Adjunto da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, CEP: 79804-970, Dourados – MS, e-mail: [claudiadamiani@ufgd.edu.br](mailto:claudiadamiani@ufgd.edu.br)

## ABSTRACT

This study aimed to obtain a protocol for disinfection and *in vitro* establishment of stem explants of *Annona crassiflora* Mart. as an alternative form of propagation of the species. The plant material was obtained from young vegetative branches collected from plants found in Cerrado areas of city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul. To achieve the proposed objectives, two experiments were conducted: *Experiment 1*: Effect of exposure time (10, 15, 20 minutes) and disinfect (calcium hypochlorite and sodium hypochlorite at 2.5%); *Experiment 2*: Effect of the culture medium (WPM and MS) of cultivation and pH (5.2, 5.4 and 5.8). The evaluations were performed at 7, 14 and 28 and / or 56 days, with the final evaluation computed as before. The following variables were analyzed: percentage of bacterial contamination, percentage of fungal contamination, percentage of oxidized explants and percentage of explants *in vitro* established (were considered as "established" those who issued shoots). From the results obtained it was concluded that during the *in vitro* establishment of *A. crassiflora*, the sodium hypochlorite has greater efficiency in the control of bacterial contamination, and in 15 minutes of exposure the contamination has reduced by approximately 50% explant, regardless the type of hypochlorite (calcium or sodium). The MS medium with pH 5.8 causes less oxidation of explants, but the WPM medium with pH 5.4 was more effective in controlling this variable.

**Keywords:** 'marolo', micropropagation, tissue culture.

## INTRODUÇÃO

O Cerrado constitui o segundo maior bioma do país e apresenta uma flora, que é considerada a mais rica dentre as savanas do mundo, com destaque às espécies frutíferas, geralmente exploradas de forma extrativista e predatória, ainda que possuam elevado potencial para a exploração sustentada a médio e curto prazo (VIEIRA, 2010). Nesta situação encontra-se o marolo (*Annona crassiflora* Mart.), uma das 25 espécies mais frequentes nesse bioma, aproveitada pela população local para uso alimentar e medicinal (BARBOSA, 1996). O marolo ou araticum do cerrado é encontrado em vários estados brasileiros é muito apreciado pelo aroma e sabor dos seus frutos, o que caracteriza um mercado emergente para as frutas nativas do Cerrado. Esta espécie, no entanto, é encontrada quase que exclusivamente em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (SILVA et al., 2001).

A espécie apresenta risco de extinção devido ao desmatamento crescente na região do Cerrado e ao extrativismo, ainda que seja considerada uma cultura rentável, principalmente para as famílias que vivem de sua exploração. Logo, pequenos plantios da sua árvore podem garantir a sobrevivência e a perpetuação da espécie. O araticum do cerrado é considerado uma espécie de interesse econômico, principalmente pelo aproveitamento de seus frutos na culinária. (CARVALHO, 2002).

A propagação da *Annona crassiflora* (Mart.) é realizada por métodos vegetativos e por meio de sementes (PINTO, 2005). Entretanto, as sementes dessas plantas apresentam dormência causada por inibidores de germinação (GEORGE e NISSEN, 1987; GAMA e MANICA, 1994), fazendo com que a germinação seja demorada e de forma irregular (PINTO, 2005; MELO, 2005).

De acordo com Vieira et al., (2010) entre as necessidades de pesquisa com a espécie encontra-se a produção de mudas. Uma vez que, a produção sexuada da espécie é irregular, uma alternativa encontra-se na propagação *in vitro*. Alternativamente às técnicas de propagação tradicional, o cultivo *in vitro* através da micropropagação pode apresentar 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). Uma das etapas da micropropagação é o estabelecimento *in vitro*. Contudo, vários fatores

interferem no sucesso do estabelecimento, dentre eles, a contaminação e oxidação (ANDRADE, 2002).

O estabelecimento *in vitro* das espécies lenhosas, assim como ocorre com a maioria das frutíferas, apresenta problemas de contaminação e a oxidação (SCHUCH e ERIG, 2005). Um fator problemático consiste na origem do material utilizado como matriz para o estabelecimento *in vitro*. No caso da ausência de uma casa de vegetação ou de plantas matrizes cultivadas em condições controladas, o uso de plantas provenientes do campo como fonte de explantes, geralmente resulta em maior grau de contaminação e um baixo percentual de sobrevivência (PASQUAL et al., 2010).

As plantas matrizes oriundas do campo ficam expostas a intempéries a pragas, que provocam ferimentos na planta, tornando-as mais susceptíveis a entrada de microorganismos patogênicos. A utilização de matrizes com qualidade fitossanitária é de extrema importância, pois a contaminação por microrganismos compromete o crescimento e desenvolvimento dos explantes, uma vez que, fungos e bactérias, normalmente, competem com as plantas pelos nutrientes e vitaminas do meio de cultura, afetando o normal desenvolvimento destes podendo levá-los, inclusive a morte (SCHERWINSKI-PEREIRA e COSTA, 2010).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo obter um protocolo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de *Annona crassiflora* (Mart.), avaliando diferentes tempos de desinfestação e tipo de desinfestante, bem como, o meio de cultura e pH de cultivo, visando controlar e diminuir os índices de contaminação durante o estabelecimento *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Botânica e Multiuso, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, nos períodos Maio de 2012 a Julho de 2013. O material vegetal foi obtido de ramos vegetativos jovens de *Annona crassiflora* (Mart.) coletados na reserva florestal do 20º Regimento de Cavalaria Blindado do Exército Brasileiro (Anexo 1A), em Campo Grande (Mato Grosso do Sul). No laboratório, os ramos foram lavados em água corrente e suas folhas retiradas (Anexo 1B). Para todos os experimentos, o preparo dos



explantes consistiu na secção dos ramos vegetativos em segmentos nodais com aproximadamente 2,0 cm contendo duas gemas laterais, inoculados em tubos de ensaio contendo 7,0 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e MCCOWN, 1980) previamente preparado e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. O meio de cultura foi acrescido de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C por um período de 7 dias de escuro e após este período mantidos sob luminosidade controlada com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

Para atingir os objetivos propostos foram realizados dois experimentos conforme descritos a seguir. Em ambos os experimentos, as avaliações foram realizadas de forma sequencial aos 7; 14 e analisados após a inoculação somente ao final de 28 dias. As variáveis numéricas 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 mortos por contaminação ou totalmente oxidados foram descartados (Anexo 2C).

#### ***Experimento 1: Efeito do tipo de desinfestante e do tempo de desinfestação***

Os fatores estudados foram o tempo de desinfestação (10; 15 e 20 minutos) e o tipo de desinfestante (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo), no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, totalizando 6 tratamentos com 4 repetições. Cada repetição foi constituída de 8 tubos de ensaios contendo um explante cada. A esterilização superficial dos ramos vegetativos foi realizada em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 1 minuto e posteriormente realizaram-se os tratamentos com a adição de uma gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução de hipoclorito (de acordo com o tratamento), seguido da lavagem do material vegetal por três vezes com água estéril. Após o processo de esterilização superficial os explantes foram preparados e inoculados em meio de cultura.

#### ***Experimento 2: Avaliação do tipo de meio de cultura e pH de cultivo***

Os fatores estudados foram dois tipos de meio de cultura, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (Wood Plant Medium - LLOYD e MCCOWN, 1980) e diferentes

pH de cultivo (5,0; 5,4 e 5,8). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, totalizando 6 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de 4 repetições, cada uma com 8 tubos de ensaio contendo um explante cada. Para a realização dos tratamentos, após o *toalete*, os ramos vegetativos foram levados para câmara de fluxo laminar e esterilizados superficialmente com álcool 70% por um minuto, seguido da desinfestação por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5%, adicionado de uma gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução de hipoclorito. Após a desinfestação, os ramos foram lavados em água estéril por 3 vezes, seguido da preparação dos explantes e inoculação em tubos de ensaio nos diferentes meios, conforme o tratamento descrito anteriormente.

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/ou por regressão polinomial, por meio do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Experimento 1: Efeito do tipo de desinfestante e do tempo de desinfestação***

Quanto ao agente desinfestante utilizado verificou-se que o hipoclorito de sódio reduziu significativamente a contaminação bacteriana se comparado ao hipoclorito de cálcio, respectivamente, 35,4% e 87,5% (Tabela 1).

Em relação à contaminação fúngica, as médias analisadas não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Os valores de contaminação fúngica observados foram muito elevados, superiores a 90%. A maior eficiência do hipoclorito no controle da contaminação bacteriana em comparação à fúngica pode ser explicada pelo fato do cloro, principal componente do hipoclorito, quando liberado em meio aquoso atuar na inibição enzimática via desnaturação proteica e inativação de ácidos nucléicos, o que, de acordo com Pasqual et al. (2002), por inativar enzimas e agir como oxidante, tem ação bactericida.

Quanto às variáveis, oxidação dos explantes e estabelecimento *in vitro*, os dados obtidos não diferiram estatisticamente, sendo observada uma média geral de 60% de

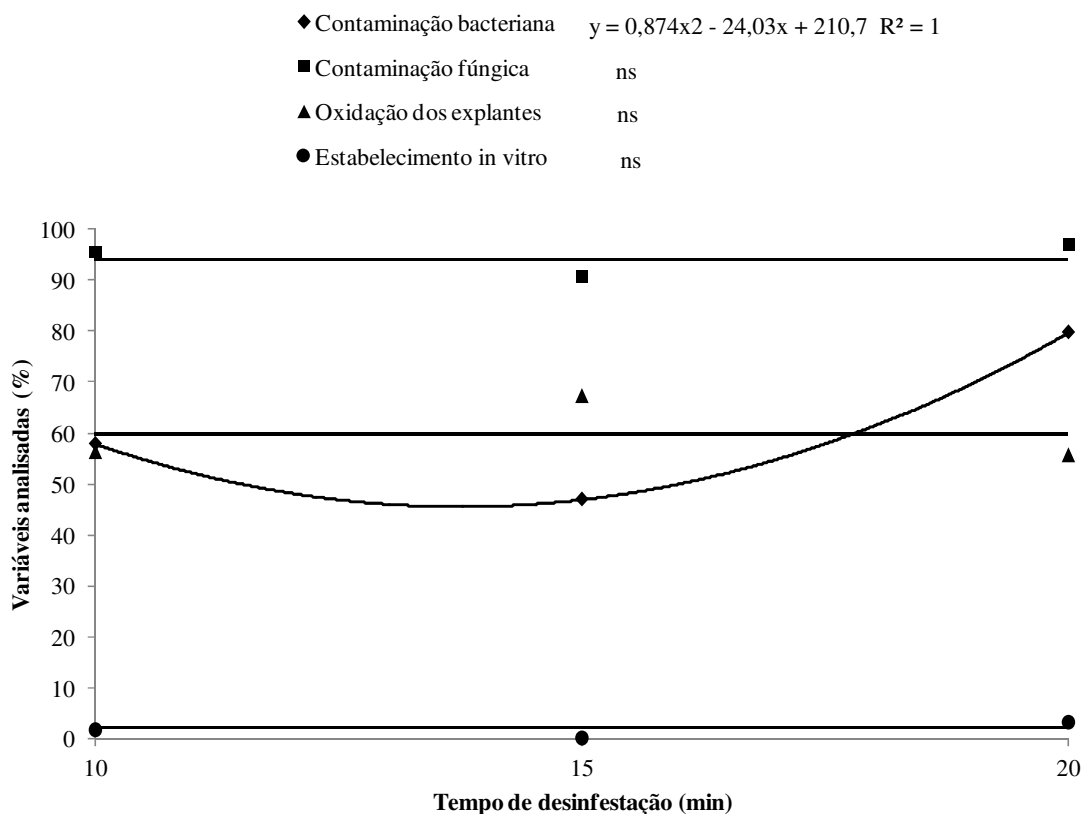
explantes oxidados e 1,55 de explantes estabelecidos. O baixo percentual de estabelecimento verificado, provavelmente está relacionado ao elevado percentual de contaminação fúngica e oxidação. De acordo com Schuch e Erig (2005), dois problemas comumente encontrados no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas são a contaminação e a oxidação. Em acréscimo, outro fator agravante está na origem do material utilizado como matriz para o estabelecimento *in vitro*. O uso de ramos vegetativos de plantas provenientes do campo como fonte de explantes, geralmente resulta em maior grau de contaminação e um baixo percentual de sobrevivência. Fungos e bactérias, normalmente, competem com as plantas pelos nutrientes e vitaminas do meio de cultura, afetando o desenvolvimento, podendo leva-las, inclusive a morte (SCHERWINSKI-PEREIRA e COSTA, 2010).

**Tabela 1.** Efeito do tipo de desinfestante na porcentagem de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados e no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* (Mart.) ao final de 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

<b>Tipo de desinfestante</b>	<b>Contaminação bacteriana (%)</b>	<b>Contaminação fúngica (%)</b>	<b>Explantes oxidados (%)</b>	<b>Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)</b>
<b>Hipoclorito de Sódio</b>	35,4 B*	97,9 A	52,1 A	1,55 A
<b>Hipoclorito Cálcio</b>	87,5 A	90,6 A	67,2 A	2,1 A
<b>DMS (%)</b>	14, 8	10, 5	24, 1	4, 1

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se pelos resultados obtidos que a desinfestação por 15 minutos, independente do tipo de desinfestante foram mais efetivas no controle da contaminação bacteriana (Figura 1), respectivamente 46% quando comparado ao tratamento por 20 minutos, onde se verificou 80% de contaminação. Não houve interação entre os fatores tempo de desinfestação e tipo de desinfestantes.



**Figura 1.** Efeito do tempo de desinfestação na porcentagem de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados e no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* (Mart.) ao final de 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

Com relação ao tempo de exposição ao desinfestante, não houve diferenças significativas para as variáveis oxidação, contaminação fúngica e estabelecimento *in vitro*. No entanto, a desinfestação por 10 e 15 minutos foram mais efetivas no controle da contaminação bacteriana. De acordo com George (1993) a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos.

O sucesso da técnica de micropropagação tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e com maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. As espécies arbóreas apresentam dificuldade para o estabelecimento *in*

*in vitro* devido à grande diversidade de microrganismo contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos (COUTO et al., 2004). Os agentes desinfestantes comumente utilizados na cultura de tecidos para a assepsia de segmentos nodais e gemas apicais incluem o etanol, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio (HARTMANN et al., 1990; VASSIL e THORPE, 1994).

***Experimento 2: Avaliação do tipo de meio de cultura e pH de cultivo***

Na maioria das culturas *in vitro*, o pH de cultivo é ajustado para 5,8 e em se tratando de espécies lenhosas, o meio de cultura utilizado é o WPM. Neste experimento observou-se que a oxidação dos explantes é dependente da interação entre o fatores pH e o meio de cultura (Tabela 2). Explantes cultivados em meio MS com pH 5,8 apresentaram menor percentual de oxidação quando comparados àqueles crescidos em meio WPM com o mesmo pH, respectivamente, 43,7 e 75%. Por outro lado, com a redução do pH de cultivo para 5,4 verificou-se resultado inverso na oxidação dos explantes, obtendo-se 87,5% em meio MS e 46,85 em meio WPM. Todavia, um problema frequente durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos, que são liberados pelas células. A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas, que pode ligar-se a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula (TEIXEIRA, 2001).

**Tabela 2.** Efeito do pH de cultivo e meios de cultura na oxidação dos explantes de *Annona crassiflora* (Mart.) aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2013.

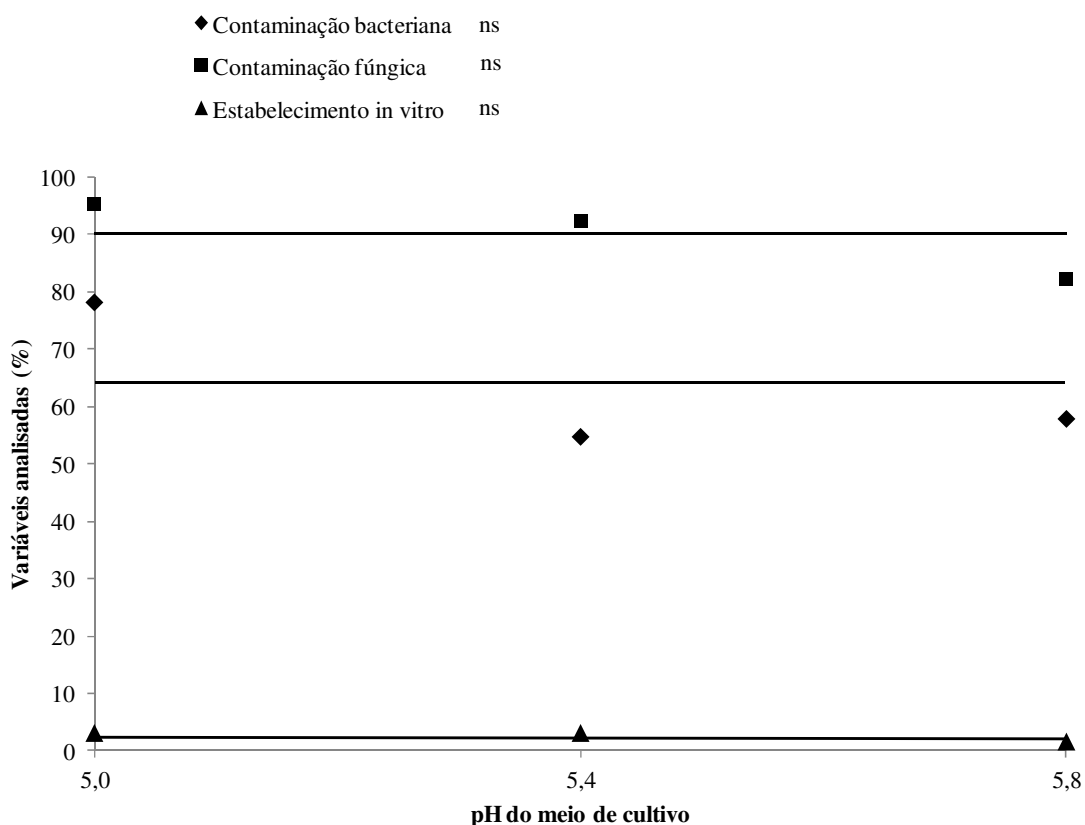
Meio de cultura	Explantes oxidados (%)		
	pH		
	5,0	5,4	5,8
MS	68,7 abA*	87,5 aA	43,7 bA
WPM	68,7 aA	46,8 aB	75,0 aA
DMS (%)	34,7		

\*Médias seguidas de letras iguais, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

De acordo com Biasi et al. (1994) a redução dos sais do meio de cultura reduz a oxidação dos explantes. Para espécies lenhosas, que apresentam uma elevada produção de

compostos fenólicos e como consequência, maior susceptibilidade à oxidação *in vitro*, o uso do meio WPM é uma alternativa eficiente por apresentar uma concentração de sais reduzida em comparação ao meio MS (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998). No entanto, os resultados obtidos neste experimento demonstram que em pH 5,0 não há diferenças entre o meio MS e WPM na oxidação dos explantes. Porém, como pode ser visualizado na Tabela 2, explantes cultivados em meio MS com pH 5,8 (normalmente utilizado para a maioria das culturas), apresentam menor percentual de oxidação (43,7%), valor semelhante ao obtido em meio WPM com pH 5,4 (46,8%).

Com relação às variáveis contaminação bacteriana, contaminação fúngica e estabelecimento *in vitro*, os valores observados não apresentaram diferenças significativas (Figura 2), verificando-se médias de 63,5; 90 e 2,6%, respectivamente. O baixo percentual de explantes estabelecidos se deve a alta contaminação fúngica e bacteriana.



**Figura 2.** Efeito de diferentes pH de cultivos no controle da contaminação fúngica, bacteriana e no estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* (Mart.) aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados-MS, 2013.

## CONCLUSÃO

- A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o hipoclorito de sódio apresenta maior controle da contaminação bacteriana, enquanto que para a mesma variável, a exposição ao agente desinfestante por 15 minutos reduz em aproximadamente 50% a contaminação dos explantes, independentemente do tipo de hipoclorito.
- A oxidação dos explantes é dependente do tipo de meio e do pH utilizado. Em pH de cultivo 5,8 o meio MS causou menor oxidação dos explantes, já em pH 5,4, o meio WPM é mais eficiente no controle desta variável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002, 16 p.

ALFENAS, A.C.; ZUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG, UFV, p.20-157, 2004.

BARBOSA, A.S. 1996. **Sistema biogeográfico do cerrado**: alguns elementos para sua caracterização. Editora UCG, Goiânia. 44 p.

BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, 1994.

CARVALHO, J. A. **Araticum: o doce aroma do Cerrado**. Minas Gerais: Gráfica Editora Folha Machadense, 2002, 20p.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

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.

GAMA, F.; MANICA, I. Propagação. In: MANICA, I. **Cultivo das anonáceas**: Ata, Cherimólia, Graviola. Porto Alegre: EVANGRAF, 1994. p. 30-37.

GEORGE, A.P.; NISSEN, R.J. Propagation of *Annona* species: a review. **Scientia Horticulturae**. 1987, v. 33, p. 75-85.

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



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

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. (Eds) **Plant propagation: principles and practices**. 5ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.

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.

MELO, D.L.B. **Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart. 2005**. 51f. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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

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.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81p.

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.

PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; FERREIRA, F.R.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ALVES, R.E.; KIMPORA, D.J. **Fruits for the future 5: *Annona* species**. Southhampton: IPGRI, 2005. 263p.

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

SCHUCH, M.F.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178 p.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Simpósios, 2001.

VASSIL, I.K.; THORPE, T.A. **Plant cell, and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 593p.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. 1ª Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v.1, 322 p.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Annona squamosa* L.**

## ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Annona squamosa* L.

FREITAS, CRISTIANE ALMIRON BATISTA<sup>1</sup>; DAMIANI, CLÁUDIA ROBERTA<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi à obtenção de um protocolo de esterilização superficial e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de *Annona squamosa* L. O material vegetal utilizado foi coletado de plantas cultivadas na região de Dourados, Mato Grosso do Sul. Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados-MS, nos períodos de maio 2012 a novembro de 2013. Foram avaliados diferentes agentes antimicrobianos em três experimentos com um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada repetição constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada. *Experimento 1*: efeito dos agentes químicos (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio a 2,5%), em diferentes tempos de exposição (10, 15 e 20 minutos). *Experimento 2*: efeito do cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) em diferentes concentrações: 0 (controle); 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 (controle) hipoclorito de sódio a 2,5%; 10; 20; 30 e 40%. Verificou-se que a desinfestação dos explantes tratados com hipoclorito de sódio apresentaram menores porcentagens de contaminação fúngica. Aumentando-se o tempo de exposição ao desinfestante para 20 minutos, reduziu-se a contaminação em 12,5%. Os explantes tratados com hipoclorito de cálcio apresentaram um resultado inverso: num tempo mínimo de exposição (10 minutos) ocorreu o controle da contaminação fúngica em 12,5%. Explantes tratados com cloreto de mercúrio na concentração de 0,075% apresentaram redução significativa da contaminação bacteriana, porém não reduziu a contaminação fúngica. Com a adição de peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio a 2,5%, foram obtidos cerca de 25% de explantes estabelecidos.

**Palavras-chave:** pinha, micropropagação, contaminação *in vitro*.

---

<sup>1</sup>Bióloga, Mestranda em Biologia Geral-Bioprospecção, Bolsista CAPES, FCBA/UFGD, e-mail: [crisabf@yahoo.com.br](mailto:crisabf@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Bióloga, Dra., Prof<sup>o</sup>. Adjunto da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, CEP: 79804-970, Dourados – MS, e-mail: [claudiadamiani@ufgd.edu.br](mailto:claudiadamiani@ufgd.edu.br)

## ABSTRACT

The objective of this study was to obtain a protocol for surface sterilization and *in vitro* establishment of shoot explants of *Annona squamosa* L. The plant material was collected from plants grown in the region in the city of Dourados, State of Mato Grosso do Sul. The experiments were conducted in the laboratories of the FCBA - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (or “Biological and Environmental Sciences College”) of UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados, on the period May 2012 to November 2013. The antimicrobial agents were evaluated in three experiments with a completely randomized design with 4 replications. Each repetition consisted of 8 test tubes containing plants each. Experiment 1: Effect of the chemical agents (sodium hypochlorite and calcium hypochlorite at 2.5%) for different exposure times (10, 15 and 20 minutes). Experiment 2: effect of mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) at different concentrations: 0 - control, 0.025, 0.050, 0.075 and 0.100%. Experiment 3: Effect of the agent hydrogen peroxide added to sodium hypochlorite at concentrations of 0 - control – sodium hypochlorite at 2.5%; 10, 20, 30 and 40%. It was verified that the disinfection of explants treated with sodium hypochlorite had lower percentages of fungal contamination. Increase the exposure time to disinfect in 20 minutes reduced contamination in 12.5%. The explants treated with calcium hypochlorite showed an opposite result: in a minimum exposure time (10 minutes) control of fungal contamination occurred in 12.5%. Explants treated with mercury chloride at a concentration of 0.075% showed a significant reduction of bacterial contamination, but could not handle the fungal contamination. Were got about 25% of established explants with the addition of hydrogen peroxide with sodium hypochlorite at 2.5%.

**Key-words:** sugar-apple, micropropagation, *in vitro* contamination.

## INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque em nível mundial pelo volume de produção e comercialização da família Annonaceae, com mais de 120 gêneros e algumas centenas de espécies, destacando-se a pinheira (*Annona squamosa* L.), conhecida também como pinha, fruta-do-conde ou ata (JUNQUEIRA, 2003).

A pinheira (*Annona squamosa* L.) tem origem na América Tropical, mais especificamente nas Antilhas, e encontra-se disseminada em quase todos os continentes (SILVA et al., 2013), sendo considerada uma das espécies de grande expressão econômica do Brasil, devido a demanda crescente no mercado doméstico e mundial de produtos naturais e exóticos (NOGUEIRA et al., 2005). O fruto dessa espécie possui grande potencial nutritivo e são muito apreciados devido a sua polpa de sabor adocicado, podendo ser consumido in natura ou sob a forma de doces, geleias, sucos, licores, tortas, iogurtes ou sorvetes (PINTO et al, 2005).

No caso da pinha, a propagação por sementes pode produzir plantas geneticamente diferentes, com floração irregular e frutos de má qualidade. Assim, para a obtenção de plantas comercialmente produtivas, é necessária a propagação vegetativa, por enxertia, estaquia, mergulhia ou por micropropagação (MANICA, 2003). A propagação de anonáceas por meio de sementes apresenta alguns inconvenientes, como a segregação genética e o retardo do seu florescimento, acarretando a produção de frutos de má qualidade. A utilização da multiplicação por micropropagação permite a produção de clones desejáveis e sadios, sendo por isso considerada uma técnica mais eficiente e mais vantajosa quando comparada a outros métodos tradicionais, como a reprodução vegetal ou por semente (MANICA, 2003).

A vantagem dessa técnica é a possibilidade de poder controlar as condições ambientais (CRUZ et al., 2009), obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI e SCHUCH, 2008), como ocorre com diversas espécies típicas do Cerrado.

O processo de propagação pode, ainda, garantir o desenvolvimento apropriado, permitindo também eventuais ajustes, possibilitando a produção em larga escala de mudas obtidas em curto espaço de tempo, utilizando uma área relativamente pequena, se

comparada com o sistema convencional, aumentando a produtividade e a longevidade das plantas em até 30% (CRUZ et al., 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo obter um protocolo de estabelecimento *in vitro*, avaliando o efeito de diferentes tratamentos com agentes antimicrobianos, visando principalmente controlar e diminuir os índices de contaminação durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* L.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Botânica e Multiuso, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, nos períodos Maio de 2012 a Julho de 2013.

O material vegetal foi obtido de ramos vegetativos jovens de *Annona squamosa* L. coletadas em áreas na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, no período de maio 2012 a novembro de 2013. (Anexo 3E). No laboratório, os ramos foram lavados em água corrente e suas folhas retiradas (Anexo 3F). Para todos os experimentos, o preparo dos explantes consistiu na secção dos ramos vegetativos em segmentos nodais com aproximadamente 2,0 cm contendo duas gemas laterais, inoculados em tubos de ensaio contendo 7,0 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e MCCOWN, 1980) previamente preparado e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. O meio de cultura foi acrescido de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C por um período de 7 dias de escuro e após este período mantidos sob luminosidade controlada com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

Para atingir os objetivos propostos foram realizados três experimentos conforme descritos a seguir. Em todos os experimentos, as avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 28 e/ou 56 dias após a inoculação, sendo os dados computados somente ao final de 28 e/ou 56 dias. As variáveis numéricas analisadas foram porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, porcentagem de explantes oxidados, e, porcentagem de explantes estabelecidos, sendo considerados estabelecidos somente explantes que emitiram brotações. Durante as

avaliações os explantes mortos por contaminação ou totalmente oxidados foram descartados.

***Experimento 1: Efeito do tipo de desinfestante e do tempo de desinfestação***

Os fatores estudados foram o tempo de desinfestação (10; 15 e 20 minutos) e o tipo de desinfestante (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo), no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, totalizando 6 tratamentos com 4 repetições. Cada repetição foi constituída de 8 tubos de ensaios contendo um explante cada. Para o estabelecimento *in vitro*, após o toailete, os segmentos nodais foram esterilizados superficialmente com álcool 70% por 1 minuto, seguido da desinfestação nos diferentes tratamentos. Durante o processo de desinfestação foi adicionado uma gota de Tween 80. Após a realização dos tratamentos, o material vegetal foi lavado em água estéril por 3 vezes, seguido da preparação dos explantes e inoculação no meio de cultura.

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

Os tratamentos consistiram da esterilização superficial dos ramos em solução de cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ) nas seguintes concentrações: 0,0 (controle ); 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 %, totalizando 5 tratamentos. Para cada 500 mL de solução foi adicionado uma gota de Tween 80. Os ramos foram mantidos em agitação por 15 minutos nos respectivos tratamentos e posteriormente lavados com água estéril por 3 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.

***Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) adicionado ao hipoclorito de sódio (NaClO) na desinfestação dos explantes.***

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



Os ramos vegetativos foram inicialmente lavados e as folhas retiradas em água corrente. Após a retirada das folhas, os ramos vegetativos foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram realizados os tratamentos. Durante os procedimentos de esterilização superficial, os ramos vegetativos foram imersos em álcool 70% por 30 segundos. Em seguida foram imersos 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.

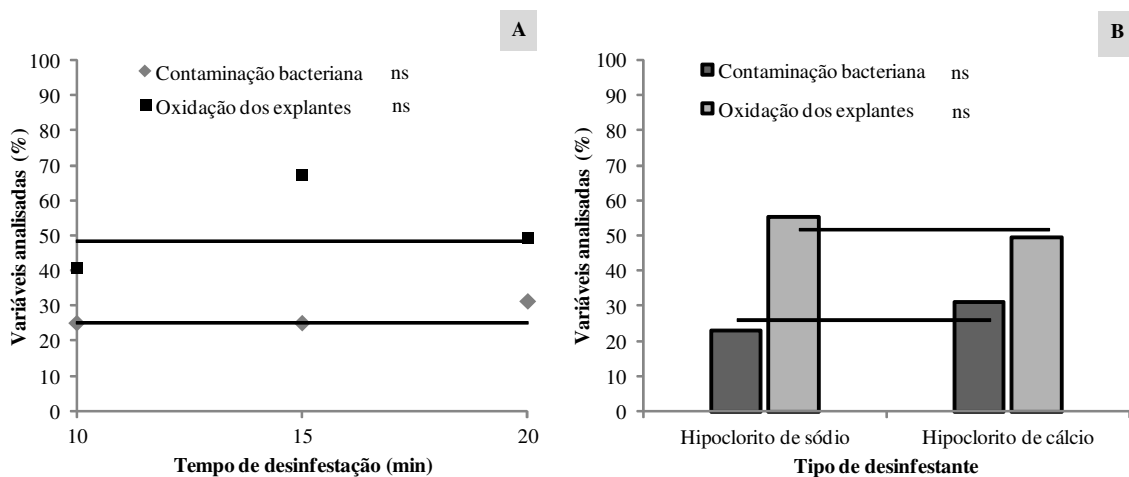
Os dados obtidos em porcentagem nos três experimentos foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $X/100$ , onde X foi o valor obtido, e, submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ) e/ou por regressão polinomial,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

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Experimento 1: Efeito do tipo de desinfestante e do tempo de desinfestação***

Explantes tratados com hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio, independente do tempo de exposição, apresentaram o mesmo índice de contaminação bacteriana. Foi observada a presença de bactérias a partir do sétimo dia de cultivo. Após vinte oito dias as taxas de contaminação bacteriana ficaram com médias de 27,1% (Figura 1A). Um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante in vitro diz respeito à contaminação bacteriana ou fúngica, em especial na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. É frequente também a presença de contaminação no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais frequente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (TEIXEIRA, 2005).

Os explantes apresentaram um total de perdas por oxidação de 52,4%. Independente do tipo de desinfestante utilizado, todos os explantes apresentaram alta taxa de oxidação, culminando na necrose dos mesmos, ou seja, não houve explantes estabelecidos (Figura 1B).



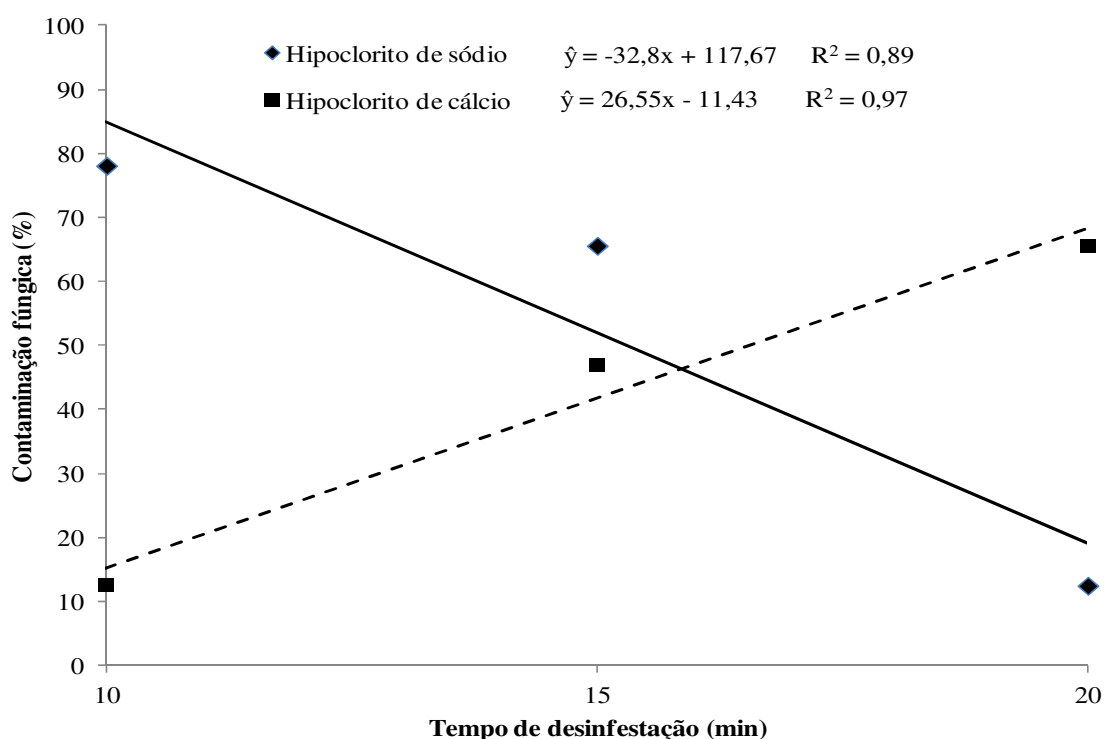
**Figura 1.** A) Efeito do tempo de desinfestação na porcentagem de contaminação bacteriana, explantes oxidados, e B) Efeito do tipo de desinfestante na porcentagem de contaminação bacteriana e oxidação de *Annona squamosa* (L.) ao final de 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

A oxidação polifenólica é um processo metabólico natural da planta que inibe o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, principalmente em explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos (SARTOR et al., 2013). 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. O hipoclorito de sódio, sendo um desinfestante forte, possivelmente influenciou na oxidação dos explantes (CID e TEIXEIRA, 2010).

Trabalhos realizados por Schuch e Erig (2003) demonstram resultados semelhantes, onde os explantes tratados com hipoclorito de sódio apresentaram aos 21 dias de cultivo, uma oxidação com média de 32%. Esses autores relatam que em duas a três horas após o isolamento dos explantes e sua transferência para os tubos de ensaio já se observava a liberação de compostos fenólicos no meio de cultura e sua oxidação (indicada pelo escurecimento do meio de cultura e das superfícies cortadas dos explantes), tornando-se mais intensa ao passar dos dias, até mostrar-se como o principal entrave para o estabelecimento *in vitro*. Segundo Modgil et al. (1999), a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, e segundo Grattapaglia e Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos,

precursores da síntese de lignina. Modgil et al. (1999) também verificaram elevada oxidação (34,25%) no estabelecimento *in vitro* de macieira cv. Tydeman's Early Worcester utilizando ápices caulinares e segmentos nodais como explantes.

Os explantes tratados com hipoclorito de sódio no tempo de 10 minutos de exposição apresentaram índices de contaminação fúngica de 85%. Com o aumento do tempo de exposição para 20 minutos houve uma redução da contaminação fúngica para 12,5%. Já os explantes tratados com hipoclorito de cálcio por 10 minutos reduziram a contaminação fúngica para 12,5%, enquanto que o tratamento por 20 minutos aumentou a contaminação fúngica para 65% (Figura 2).



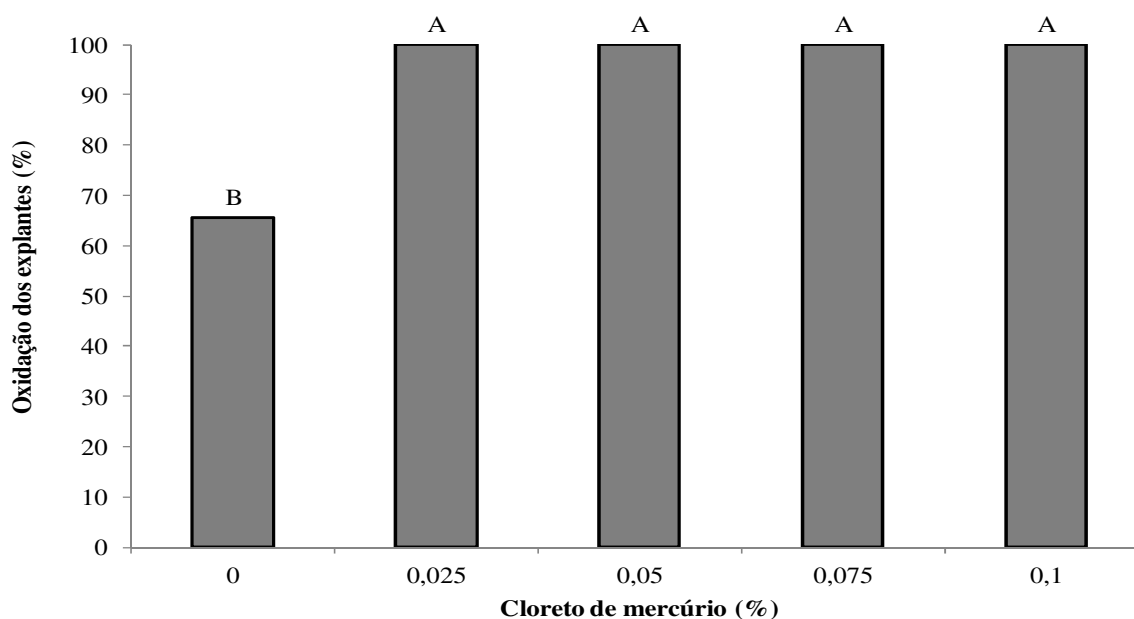
**Figura 2.** Efeito do tempo de desinfestação e do tipo de desinfestante no controle da contaminação fúngica dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.) ao final de 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

Embora os resultados obtidos no presente estudo demonstrar um efeito positivo na utilização do hipoclorito de sódio em comparação com o hipoclorito de cálcio no controle da contaminação fúngica durante o estabelecimento *in vitro*, de acordo com Alfenas et al. (2004), a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem da espécie e do material vegetal, pois as respostas variam em função da sensibilidade dos tecidos. Uma

desinfestação eficiente deve eliminar os micro-organismos e não causar danos ou morte aos tecidos. Em ramos de porta-enxerto Mr. S. 2/5%, Chaves et al. (2004) compararam o uso de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio (0,5%; 1,0%; 1,5% e 2%) na desinfestação dos explantes e constataram que o hipoclorito de sódio é mais eficiente do que o hipoclorito de cálcio em todas as concentrações. Diniz et al. (2008) também realizaram este experimento comparativo na concentração de 2% em segmentos de rizomas de *Spathiphyllum wallisii* e obtiveram resultados semelhantes.

### ***Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na desinfestação dos explantes***

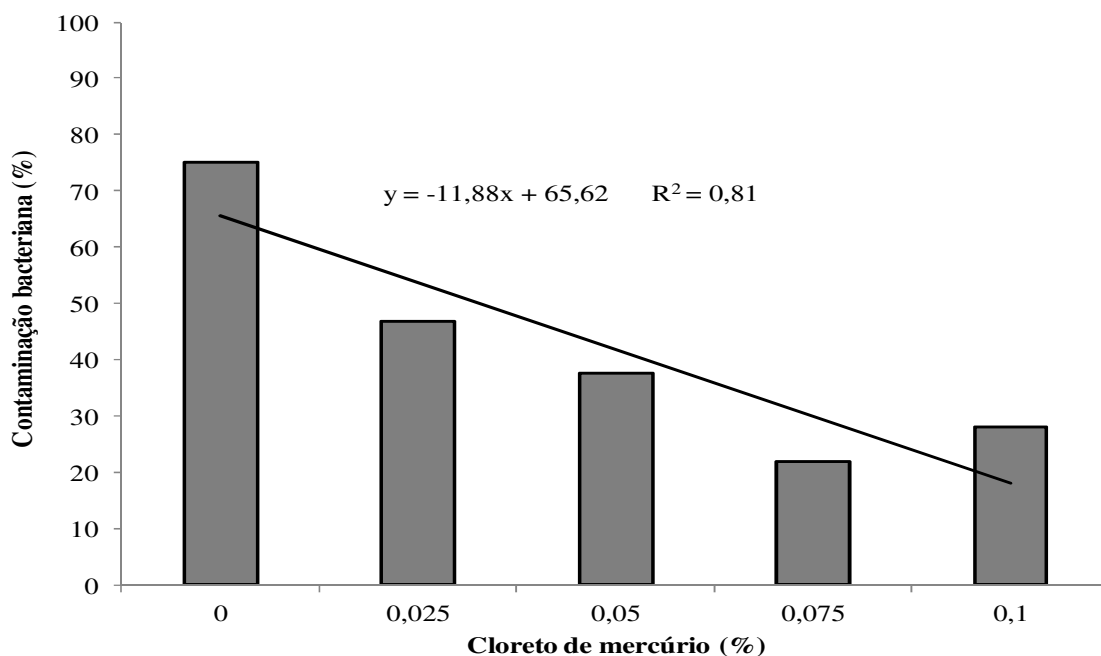
Observou-se nos tratamentos com cloreto de mercúrio um elevado percentual de oxidação dos explantes, obtendo-se 100% de oxidação (Figura 3). A oxidação elevada causou a morte dos explantes e impediu o estabelecimento *in vitro*. Por outro lado, os explantes tratados somente com hipoclorito de sódio (controle) apresentaram 65,6% de explantes oxidados.



**Figura 3.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na oxidação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), ao final de 28 dias de cultivo. UFGD, Dourados, MS, 2013. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

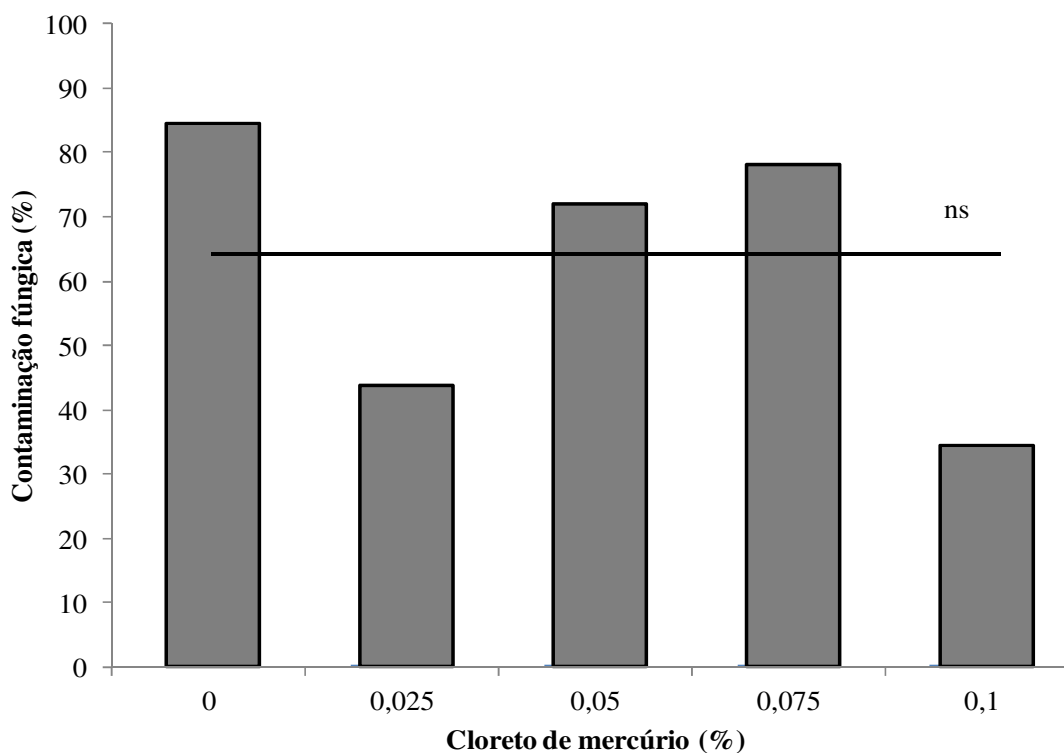
A oxidação elevada dos explantes submetidos aos testes com cloreto de mercúrio pode estar relacionada ao fato de que este desinfestante mostrou-se ser altamente tóxico para a espécie *Annona squamosa* L. Estudos com a utilização do cloreto de mercúrio na micropropagação revelou maior eficiência, como na desinfestação de brotações apicais de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) por exemplo, possibilitando taxa mais elevada de sobrevivência dos explantes (84,10%). Ribas et al.(2003) recomendaram o tratamento de 0,05% de HgCl<sub>2</sub>, durante 10 minutos.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram verificados por Dutra et al. (2008) que avaliou a eficiência de diferentes concentrações do cloreto de mercúrio nas concentrações de 0,01 a 0,5. Neste caso, o aumento da concentração de cloreto de mercúrio ocasionou maior oxidação dos explantes, coincidindo com os resultados verificados neste experimento. Fermino Júnior et al. (2009) obtiveram 73,4% de descontaminação de segmentos nodais de plantas adultas de *Tectona grandis* (L.) quando utilizaram solução de cloreto de mercúrio na concentração de 0,1% por 15 minutos. Entretanto, nos tratamentos com mais de 15 minutos de exposição ao cloreto de mercúrio, estes autores registraram as maiores porcentagens de oxidação e as menores taxas de explantes estabelecidos.



**Figura 4.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio no controle da contaminação bacteriana dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), ao final de 28 dias de cultivo. UFGD, Dourados, MS, 2013.

Os tratamentos dos explantes com diferentes concentrações de cloreto de mercúrio produziram efeitos positivos no controle da contaminação bacteriana. Concomitante ao aumento da concentração verificou-se uma redução da contaminação bacteriana em aproximadamente 53,1% até 0,075% de cloreto de mercúrio, quando comparado ao tratamento controle (somente hipoclorito de sódio). Dentre as concentrações estudadas, o uso de 0,075% de cloreto de mercúrio reduziu a contaminação bacteriana para 21,9% (Figura 4). No entanto, reduzir a contaminação bacteriana não foi o suficiente para garantir o estabelecimento dos explantes. Os tratamentos dos explantes com cloreto de mercúrio em diferentes concentrações não apresentaram efeito significativo, apresentando média geral de 62,5% entre as concentrações estudadas (Figura 5).



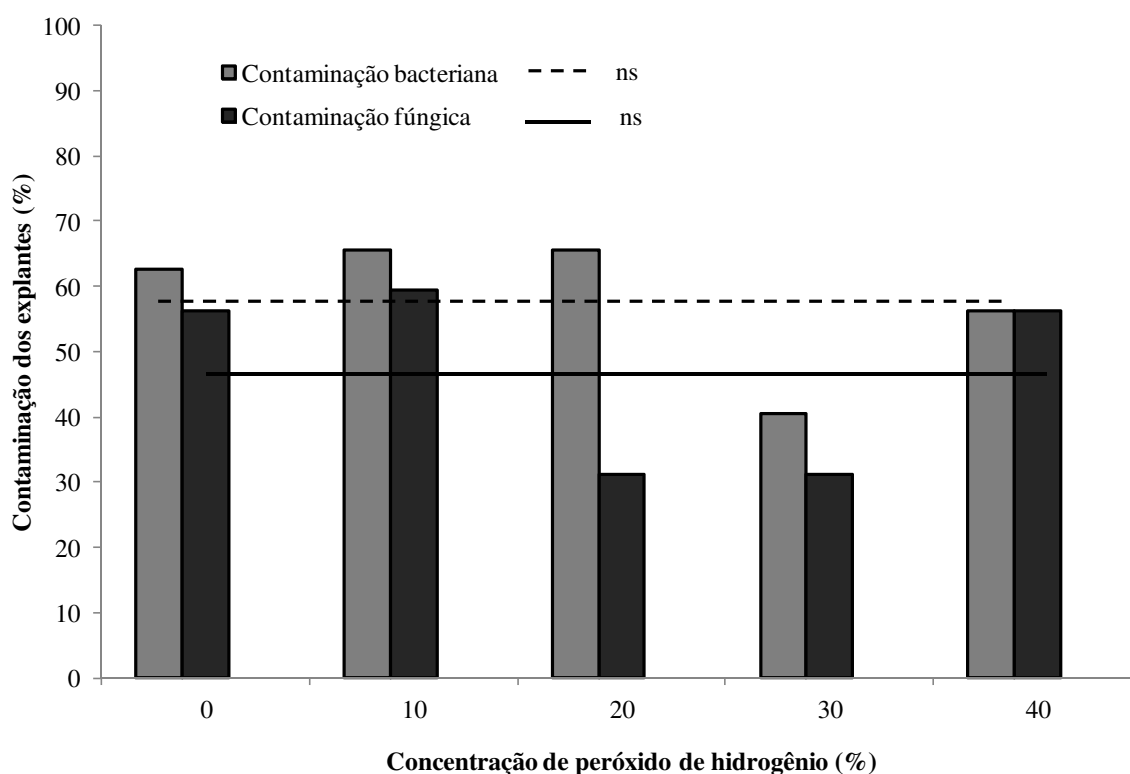
**Figura 5.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio no controle da contaminação fúngica dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), ao final de 28 dias de cultivo. UFGD, Dourados, MS, 2013. ns: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

***Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (NaClO) adicionado ao hipoclorito de sódio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na desinfestação dos explantes.***

Dentre as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio testadas neste experimento com o objetivo de controlar a contaminação, apesar dos dados não diferirem estatisticamente, foi possível verificar uma redução da contaminação bacteriana de 22% e da contaminação fúngica 24% em explantes tratados com 30% de peróxido de hidrogênio adicionado ao hipoclorito de sódio a 2,5%. Explantes tratados somente com hipoclorito de sódio apresentaram uma média de 46,9% de contaminação fúngica e de 58,1% de contaminação bacteriana (Figura 6).

É importante salientar que os de fungos e bactérias podem ser de origem endógena. O problema da contaminação bacteriana e fúngica é agravado quando os explantes são provenientes de plantas que foram cultivadas no campo (ODUTAYO et al., 2007). De acordo com Pasqual et al. (2010) plantas matrizes oriundas do campo ficam expostas a intempéries e insetos, o que provoca ferimentos na planta, tornando-as mais susceptíveis a entrada de microorganismos patogênicos.

O desenvolvimento de microorganismos no meio de cultura é um fato bastante comum, uma vez que o mesmo possui nutrientes e condições que viabilizam o crescimento de fungos e bactérias. A contaminação no ambiente *in vitro* é extremamente prejudicial, já que causa a morte ou inviabiliza a utilização da planta (PINHAL, 2012). No combate aos contaminantes oriundos do próprio explante, várias etapas de descontaminação são comumente usadas nos processos de propagação *in vitro*. 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 (CaOCl<sub>2</sub>) com teor de cloro ativo que pode variar de 2,0% a 2,5% (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). No entanto, esse processo convencional de assepsia pode não ser suficiente para eliminar completamente os microorganismos 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).

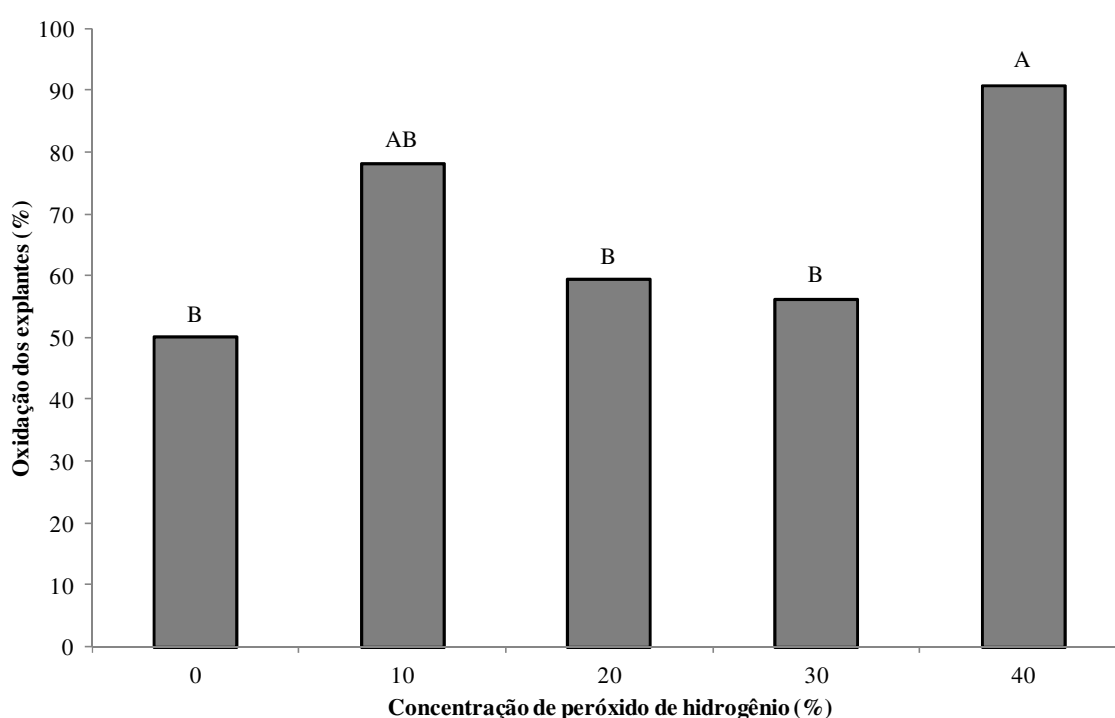


**Figura 6.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) adicionados ao hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ) no controle da contaminação bacteriana e fúngica dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.) aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. ns: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Observou-se neste experimento que o peróxido de hidrogênio exerce maior influência na oxidação dos explantes se comparado somente ao uso de hipoclorito de sódio. O uso de peróxido de hidrogênio na concentração de 40% causou maior oxidação dos explantes (90,6%) se comparado a concentrações inferiores ou somente ao hipoclorito de sódio (próximo a 50%) (Figura 7). Provavelmente este efeito oxidante mais acentuado observado na concentração de 40% de peróxido de hidrogênio é resultado do efeito somatório da ação de dois agentes naturalmente oxidantes, peróxido e hipoclorito. Tanto o hipoclorito de sódio quanto o peróxido de hidrogênio podem exercer um elevado poder oxidante sobre os explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO 1998). 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 (PASQUAL et al., 2002). Com a



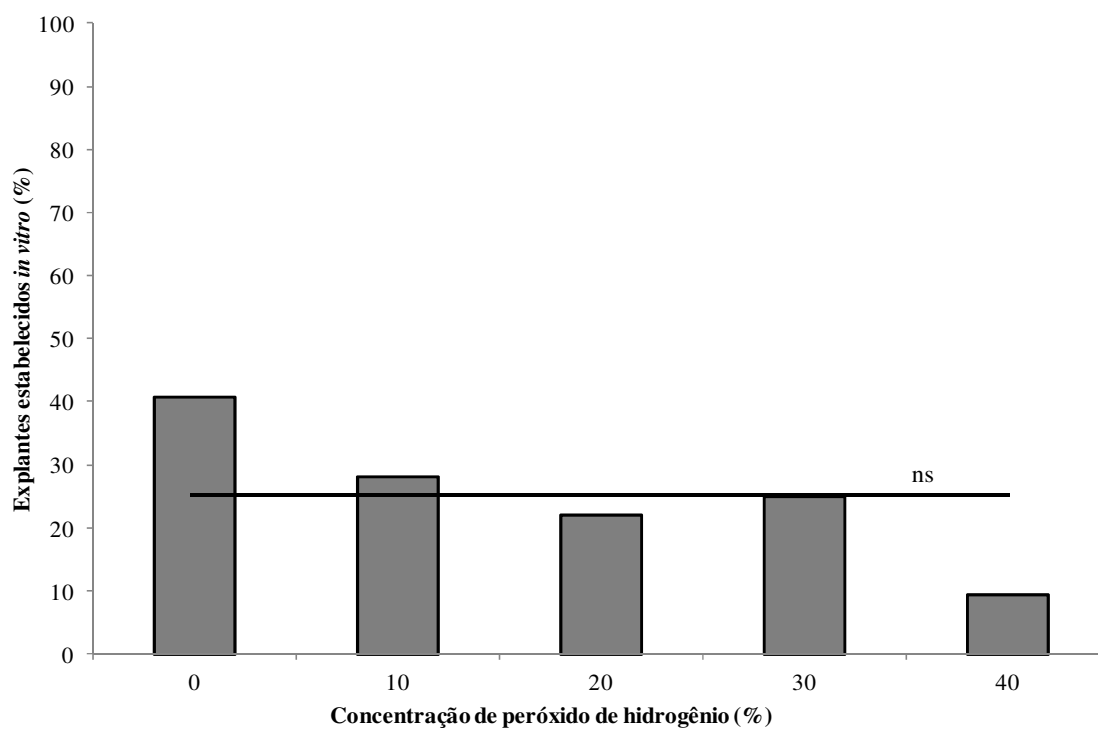
ação oxidante do cloro e do peróxido, devemos também considerar a espécie estudada. As plantas lenhosas naturalmente produzem altos teores de compostos fenólicos e que são exsudados pelo explante após a sua preparação e inoculação. Em contato com o meio de cultura, estes compostos fenólicos são oxidados. 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. Normalmente, tal reação é desencadeada no processo de senescência das plantas ou quando há injúrias nos tecidos, como por exemplo, durante a preparação dos explantes ou ocasionados pela adição dos agentes químicos no processo de desinfestação dos explantes (CID e TEIXEIRA, 2010).



**Figura 7.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) adicionados ao hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ) na oxidação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* de *Annona squamosa* (L.), aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Verificou-se que a esterilização superficial dos explantes com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio permitiu um considerável índice de explantes estabelecidos *in vitro*, embora estaticamente não houve diferença entre as medias dos tratamentos. Considerando que o tratamento de 30% obtendo-se valores médios de 25%

demonstrando que a combinação destes dois agentes desinfestantes são mais eficientes no controle da contaminação e oxidação dos explantes (Figura 8). O tratamento ideal é aquele que combina baixas taxas de contaminação fúngica, bacteriana e de oxidação, permitindo o estabelecimento *in vitro*.



**Figura 8.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) adicionados ao hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ) na porcentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de *Annona squamosa* (L.) aos 56 dias de cultivo *in vitro*. Dourados, MS, 2013. ns: Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir que:

- O controle da contaminação fúngica depende do tipo de desinfestante e do tempo de exposição ao mesmo. Quando tratados com hipoclorito de sódio, 10 minutos são suficientes para controlar a contaminação, por sua vez, quando utilizado hipoclorito de cálcio são necessários 20 minutos de exposição. No entanto, para o controle da contaminação bacteriana, nenhum dos tratamentos testados foi eficiente.
- A desinfestação com cloreto de mercúrio na concentração de 0,075% controla a contaminação bacteriana, porém, nenhuma das concentrações estudadas foi eficiente no controle da contaminação fúngica;
- O uso de 30% de peróxido de hidrogênio adicionado ao hipoclorito de sódio a 2,5% controla os níveis de contaminação bacteriana e permite a obtenção de maior número de explantes estabelecidos *in vitro* de *Annona squamosa*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todos os experimentos a contaminação fúngica ocorreu com maior frequência, porém a principal barreira para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação de *Annona squamosa* e *Annona crassiflora* foi o elevado percentual de oxidação. São necessários novos estudos para avaliar a utilização de outros agentes - ou testar outras concentrações dos desinfestantes utilizados neste trabalho. A utilização de hipoclorito de sódio para a desinfestação de explantes de pinha e araticum mostrou-se mais vantajosa que o emprego de hipoclorito de cálcio, geralmente utilizado em cultivos *in vitro*. Contudo, outras concentrações de hipoclorito de sódio e o tempo de desinfestação necessitam de novas avaliações.

Outros procedimentos a serem considerados em trabalhos futuros, visando o controle da contaminação *in vitro*: manutenção das plantas matrizes em ambiente protegido em casa de vegetação; realizar o controle fitossanitário com aplicações periódicas de fungicidas e bactericidas, além de adubações e aplicação de soluções nutritivas, para obter-se brotações mais vigorosas e saudáveis; e proceder o isolamento e identificação dos micro-organismos contaminantes são de fundamental importância, para que se possa fazer um tratamento controle específico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZUZA, E.A.V.; MAFIA,R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG, UFV, p.20-157, 2004.

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.

CRUZ, M.A.L.; SILVA, A.D.C.; VEIGA,C.M.; SILVEIRA,V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro. **Inter Science Place**, v. 5, p.1-18, 2009.

CHAVES A. da C.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J. Desinfestação de explantes de *prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira Agrocência**, v.10, n. 2, p. 249-250, abr-jun, 2004.

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.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 107-113, 2008.

DUTRA, L., F.; HANSEL, A. F; WENDLING,I. Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). In: **Boletim de pesquisa e desenvolvimento /Embrapa Florestas**, ISSN 1980-041X; 38, Embrapa Florestas, 2008.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.443-448, 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.

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, 1998. p.183-260.

JUNQUEIRA, R. M. e outros. Efeito da cobertura viva de solo cunhã (*Clitoria ternatea* L.) e da polinização artificial na produtividade da pinha (*Annona squamosa* L.) sob manejo orgânico. **Agronomia**, vol. 37, nº 2, p. 31 - 36, 2003.

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.

MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. In: **Frutas anonáceas: ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p.23-64.

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

MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

NOGUEIRA, E.A.; MELLO, N.T.C de.; MAIA, M.L.. Produção e Comercialização de Anonáceas em São Paulo e Brasil. **Informações Econômicas**, SP, v.35, n.2, fev. 2005.

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

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.

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.

PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; FERREIRA, F.R.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ALVES, R.E.; KIMPORA, D.J. **Fruits for the future 5: *Annona* species**. Southhampton: IPGRI, 2005. 263p.

PINHAL, H. F. **Estabelecimento *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.)**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, v. 13, n.1, p.115-122, 2003.

SARTOR, F. R., ZANOTTI, R. F., PÔSSA, K.F., PILON, A. M., FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SILVA, L.S. **Controle de *Ceconata anonella* (Sepp., 1830) (Lep.:Oecephoridae) e de *Bephratelloides pomorum* (Fab., 1808) (Hym.: Eurytomidae) em frutos de pinha (*Annona squamosa* L.) (Annonaceae)**. 20013. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2013. 83p.

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

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

# **ANEXOS**



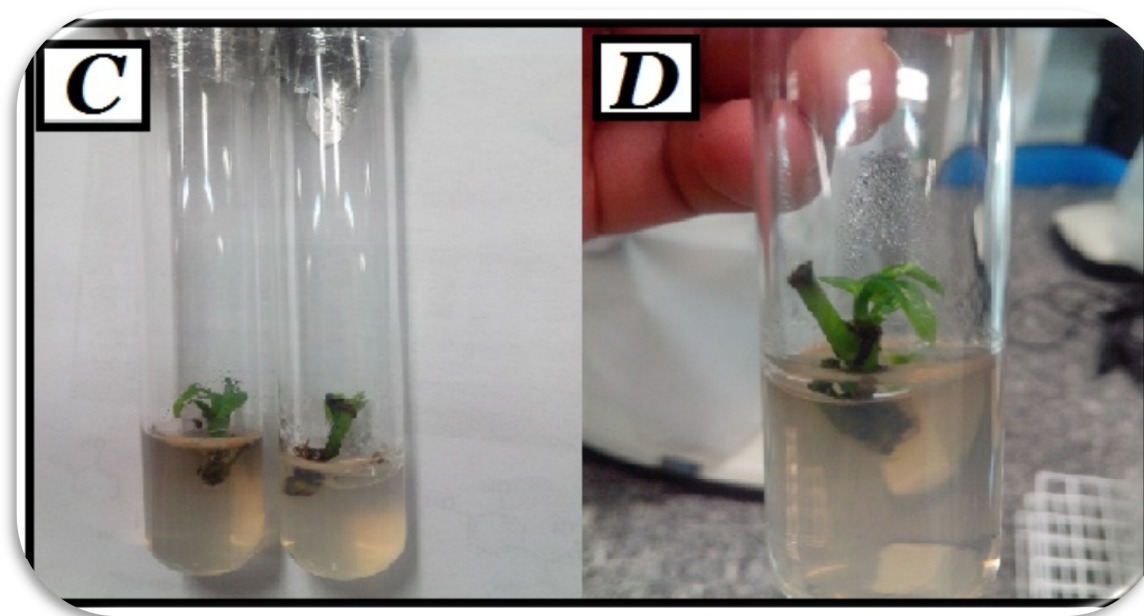
## ANEXO 1



**A)** Plantas matrizes de *Annona crassiflora* Mart. encontradas em área de Cerrado pertencente ao 20º Regimento de Cavalaria Blindado do Exército Brasileiro, Campo Grande - Mato Grosso do Sul. UFGD, Dourados, MS, 2013

**B)** Ramos vegetativos de *Annona crassiflora* Mart. utilizados para a retirada dos segmentos nodais durante o estabelecimento *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

## ANEXO 2



C) Explantes de *Annona crassiflora* Mart. tratados com hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio a 2,5% durante o estabelecimento, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

D) Explante de *Annona crassiflora* Mart. em meio de cultura WPM e pH 5,8 durante o estabelecimento, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

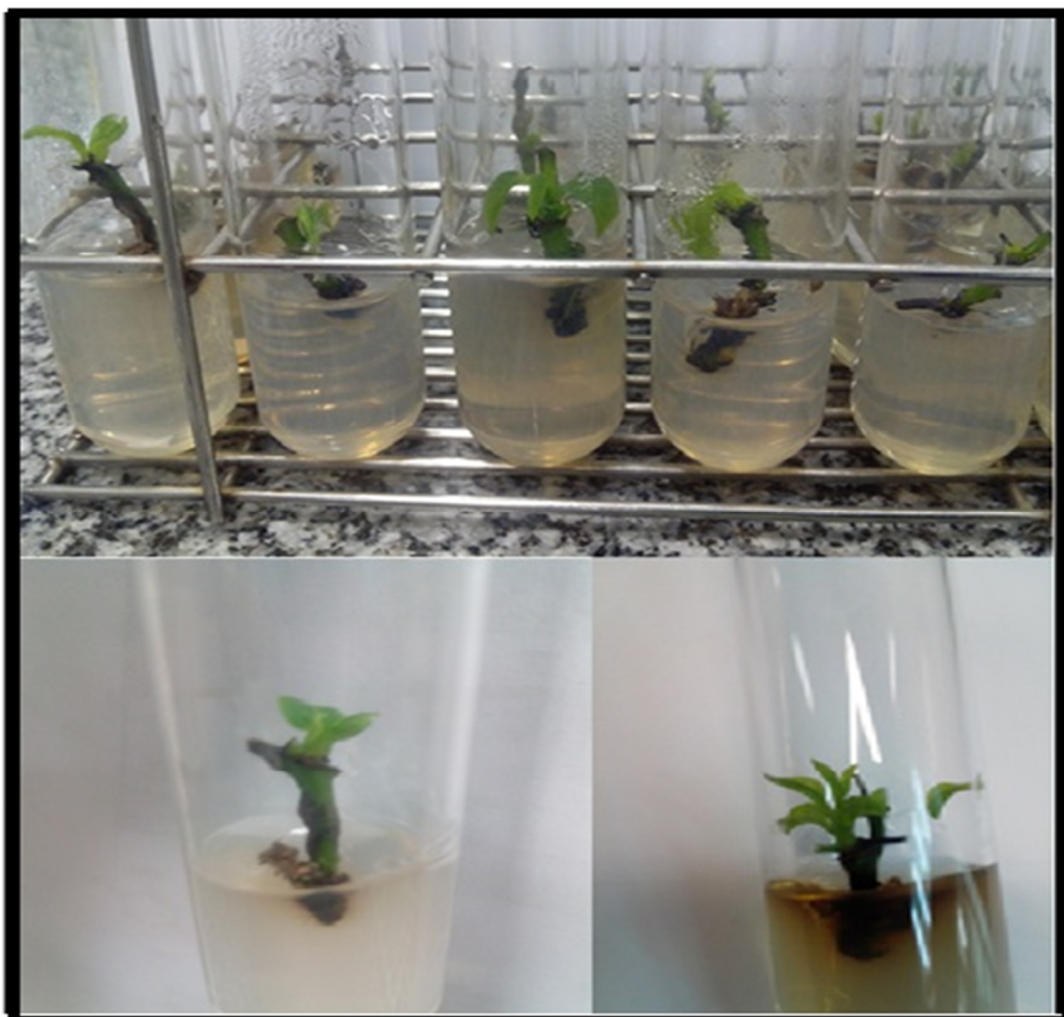
ANEXO 3



**E)** Plantas matrizes de *Annona squamosa* L. em áreas de Cerrado na região de Dourados - Mato Grosso do Sul. UFGD, Dourados, MS, 2013

**F)** Ramos vegetativos de *Annona squamosa* L. utilizados para a retirada dos segmentos nodais durante o estabelecimento *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.

ANEXO 4



G) Explantes de *Annona squamosa* L. tratados com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio adicionados ao hipoclorito de sódio durante o estabelecimento, aos 56 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados, MS, 2013.