



Desinfestação e introdução *in vitro* de *Ananas erectifolius* (L. B. Sm.)

Arlena Maria Guimarães Gato^{1*}, Simone da Silva², Efigenia Lopes da Silva², Daniele de Carvalho Rodrigues³, Flávio Freires Ferreira³, Ester Pinheiro³, Laís Medeiros de Assunção³, Vitor Rafael Pereira Marinho³

Resumo

A espécie *Ananas erectifolius* (L. B. Sm.), pertencente à família bromeliácea e ao gênero *Ananas*, é uma planta fibrosa, monocotiledônea de sistema radicular fasciculado. Essa espécie de origem amazônica é de extrema importância econômica, cuja principal utilização no agronegócio é a produção de fibras naturais que são empregadas nos setores automobilísticos, manufaturados (cordas, sacos, capacetes), papelaria (papéis, agendas, blocos, etc), indústria têxtil (sucedâneo do linho), construção civil (caixas d'água, tanques, telhas e divisórias) e demais usos agro comerciais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias eficientes para desinfestação de gemas desta espécie para introdução *in vitro*. O experimento constou dos processos de desinfestação, introdução *in vitro* e estabelecimento dos explantes em meio de cultivo MS acrescido de hormônios de crescimento (BAP e ANA) + diferentes dosagens de gentamicina (0,0; 160,0; 320 e 480 mg/L⁻¹) e (BAP e ANA) + diferentes dosagens de ampicilina (0,0; 300; 600 e 1.200 mg L⁻¹). Os melhores resultados quanto à descontaminação, após 60 dias de introdução *in vitro*, foi 52,5 e 57,5%, nos meios de cultivo MS + 2,0 L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ ANA com as concentrações de 320 e 480 mg L⁻¹ de gentamicina, cuja porcentagem de descontaminação foi de 57,5 e 52,5%, respectivamente.

Palavras-chave: desinfestação, gemas, gentamicina, ampicilina e hormônios de crescimento

Disinfestation and *in vitro* introduction of *Ananas erectifolius* (L. B. Sm.). The species *Ananas erectifolius* (L. B. Sm.), belonging to the bromeliaceae family and the genus *Ananas*, is a fibrous, monocotyledonous plant with a fasciculate root system. This type of Amazonian origin is of extreme economic importance, whose main use in agribusiness is the production of natural fibers that are used in the automobile, manufactured (rope, bags, helmets), stationery (paper, agendas, blocks, textile (linen substitute), civil construction (water tanks, tanks, tiles and partitions) and other agro commercial uses. The objective of this work was to develop efficient methodologies for the disinfestation of gemstones of this species for *in vitro* introduction. The experiment consisted of disinfestation, *in vitro* introduction and establishment of explants in MS culture medium plus growth hormones (BAP and ANA) + different dosages of gentamicin (0.0, 160.0, 320 and 480 mg / L⁻¹) and (BAP and ANA) + different dosages of ampicillin (0.0, 300, 600 and 1200 mg / L⁻¹). The best results regarding decontamination, after 60 days of *in vitro* introduction, were 52.5 and 57.5%, in the culture media MS + 2.0mg / L BAP + 0.25mg / L⁻¹ ANA with the concentrations of 320 and 480 mg / L⁻¹ of gentamicin, whose decontamination percentage was 57.5 and 52.5%, respectively.

Keywords: disinfestation, buds, gentamicin, ampicillin and growth regulator.

¹ Pesquisadora do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal – Av. Governador Danilo de Matos Areosa, Nº 690 - Distrito Industrial – CEP 69075-351 – Manaus, AM, Brasil. *Autor para correspondência: gatoarlena@gmail.com

² Pesquisador (a) do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal. simonydasilva@gmail.com, llferreira05@gmail.com

³ Auxiliar Laboratorista do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal. sterpantoja@gmail.com, danyellecar@hotmail.com, laisestrelaguia@gmail.com, lopesefigenia@gmail.com, vitorrafael0504@gmail.com



1. Introdução

A espécie *Ananas erectifolius* (L. B. Sm.) pertence à Família Bromeliácea e ao Gênero *Ananas* e ocorrem nos Estados do Pará, Acre, Mato Grosso, Goiás, Amapá e Amazonas (CORDEIRO et al, 2008). Há dois tipos distintos de curauá: um de folhas verde-claro, chamado de curauá branco e outro de folhas roxo avermelhadas, conhecido como curauá roxo (LÊDO, 1967). Apresentam folhas eretas, coriáceas, medindo cerca de 5 cm de largura, 5 mm de espessura e aproximadamente 1,5 m de comprimento. É uma planta fibrosa, monocotiledônea, terrestre, herbácea, de sistema radicular fasciculado, superficial, pouco exigente nutricionalmente e que se adapta a diferentes tipos de solo e às mudanças climáticas. No entanto, Correia et al. (2009) avaliando o crescimento de plântulas micropagadas de *Ananas erectifolius* cultivadas em diferentes substratos e em condições de casa de vegetação, na presença e ausência de adubação, verificaram que as plantas obtiveram maior número de folhas e matéria seca da parte aérea quando cultivadas em substratos enriquecidos com fertilizantes, sugerindo que a espécie pode apresentar respostas positivas à adição de nutrientes como o fósforo (P).

O curauá é uma bromeliácea de origem amazônica cuja principal utilização no agronegócio é a produção de fibras naturais que são empregadas nos setores automobilísticos, manufaturados (cordas, sacos, capacetes), papelaria (papéis, agendas, blocos, etc), indústria têxtil (sucadâneo do linho), construção civil (caixas d'água, tanques, telhas e divisórias) e demais usos agrocomerciais, estão sendo confeccionados por materiais de origem natural sendo que a fibra do curauá é uma das matérias primas empregadas. As principais características da fibra de curauá que possibilitam estes usos múltiplos são a resistência à tensão, peso reduzido e a maciez (ARAUJO, 2003).

No Brasil e no exterior, a fibra de curauá é submetida a frequentes pesquisas, que vêm apresentando resultados significativos, o que torna essa espécie a mais promissora entre as espécies produzidas na Amazônia brasileira. O emprego de fibras naturais para a produção de compósitos poliméricos contribui para evitar problemas de poluição ambiental, já que sua utilização muitas vezes substitui materiais

sintéticos baseados no petróleo (Silva & B. Tambourgi, 2011).

No entanto, para que isso ocorra são necessárias mudas para a implantação do cultivo e conseqüentemente a produção de fibras. Porém, o sistema de propagação de mudas convencional é lento e possui baixo rendimento, pois uma planta adulta é capaz de produzir no máximo 40 mudas por ano (LAMEIRA et al, 2000) e para a produção de um (1,0) ha são necessárias 25.000 mudas, logo pelo método convencional torna-se inviável o atendimento. A produção de mudas via cultura de tecidos consiste na regeneração de plantas completas (caule, folhas e raízes) a partir de gemas axilares de plantas matrizes selecionadas no campo, em plantios comerciais. A micropropagação é uma alternativa viável para a produção de mudas dessa espécie e pode ser um valioso instrumento na produção clonal de mudas de curauá ao permitir a obtenção de plantas em escala comercial, com elevada qualidade genética e fitossanitária, além da produção de mudas isentas de pragas e doenças, em curto período de tempo. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia para desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas de curauá e conseqüentemente proporcionar o atendimento quanto à produção de mudas.

2. Metodologia

O material utilizado como fonte de explantes foi coletado de plantas provenientes da área externa do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA. As plantas coletadas foram levadas para a recepção do laboratório para a primeira fase da assepsia, iniciando com a remoção das folhas e caules. Em seguida foram lavadas em água corrente e detergente neutro para remoção da sujeira superficial. Após a lavagem, foram removidas as gemas do caule e colocadas em um Becker de 500 mL contendo uma solução (5mL/2,5L) do fungicida Impact® por 17,45h sob agitação e logo após a retirada do agitador magnético, as gemas foram lavadas por três vezes em água destilada. Em seguida, o material foi colocado em Becker (100 mL de água destilada + 2mL de Tween) por 20 minutos, sob agitação.

A segunda fase de assepsia ocorreu em câmara de fluxo laminar e os procedimentos foram: lavagens sucessivas (3 vezes) em água

destilada autoclavada por 1 minuto, em álcool 70% por 5 minutos e lavadas (3 vezes) em água destilada autoclavada, por 1 minuto. Em seguida, foram colocados em solução de hipoclorito de sódio 50% por 15 minutos posteriormente lavados em água destilada autoclavada por 1 minuto e imersos por 1 minuto no antibiótico gentamicina. Após o processo de desinfestação foram inoculados 40 explantes (gemas) por tratamento em frascos de 250mL contendo 40mL de meio de cultivo MS suplementado com 2,0 mg/L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) + 0,25 mg/L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e diferentes concentrações de antibiótico: T₁= 0,0 (Gentamicina); T₂= 160 mg (Gentamicina); T₃= 320 mg/L⁻¹ (Gentamicina); T₄= 480 mg/L⁻¹ (Gentamicina); T₅= 300 mg/L⁻¹ (Ampicilina); T₆= 600 mg/L⁻¹ (Ampicilina); T₇= 1.200 mg/L⁻¹ (Ampicilina). Em seguida as culturas foram armazenadas em câmara incubadora para BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e avaliadas a cada 5 dias, por 30 dias. No final desse período os frascos foram retirados da BOD e mantidos a 25 ± 2°C sob fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de 50 μmol.m⁻².s⁻¹. Após 60 dias de cultivo, os explantes foram avaliados quanto à descontaminação e sobrevivência dos explantes.

3.Resultados

Os melhores resultados obtidos quanto à descontaminação dos explantes de *Ananas erectifolius* (L. B. Smith), após 60 dias de introdução *in vitro* foram com os tratamentos em meio de cultivo MS + 2,0 mg/L⁻¹ de BAP + 0,25 mg/L⁻¹ de ANA com as concentrações de 480 mg/L⁻¹ e 320 mg/L⁻¹ de gentamicina, cuja porcentagem de descontaminação foi de 57,5 e 52,5%, respectivamente (Tabela 1).

Quanto à descontaminação, no meio de cultura sem a adição de antibióticos (T₁), os níveis percentuais foram de 8,7%. O experimento T₂ apresentou 5% de descontaminação e os tratamentos T₃ e T₄, com adições de dosagens mais elevadas, ou seja, 320 e 480 mg/L⁻¹ de gentamicina, a descontaminação foi acima de 50%. Todos os resultados quanto à descontaminação apresentaram diferenças significativas entre si.

E, quanto à descontaminação, utilizando-se os mesmos reguladores de crescimento (MS +

2,0 mg/L⁻¹ BAP + 0,25 mg/L⁻¹ ANA) com diferentes dosagens de ampicilina (Tabela 1), os resultados dos tratamentos T₅, T₆ e T₇, variaram de 10,0 a 25,0%. Estes resultados demonstram que o processo de desinfestação utilizado e as referidas dosagens do antibiótico Ao ser utilizada a dosagem maior da ampicilina observa-se um alto percentual de processo de oxidação, quando comparados com as demais dosagens utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Taxa de desinfestação de explantes de *Ananas erectifolius*, após 60 dias de introdução *in vitro*.

| Trat. | Meio de Cultivo | Porc. Desc... (%) | Porc. Oxidação (%) |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| T ₁ | MS + 2,0mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 0,00mg/L ⁻¹ Gentamicina | 8,7 ^f | 0 |
| T ₂ | MS + 2,0 mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 160mg/L ⁻¹ Gentamicina | 5,0 ^g | 0 |
| T ₃ | MS + 2,0 mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 320mg/L ⁻¹ Gentamicina | 52,5 ^b | 0 |
| T ₄ | MS + 2,0 mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 480mg/L ⁻¹ Gentamicina | 57,2 ^a | 0 |
| T ₅ | MS + 2,0 mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 300 mg/L ⁻¹ Ampicilina | 10,0 ^e | 0 |
| T ₆ | MS + 2,0 mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 600 mg/L ⁻¹ Ampicilina | 15,0 ^d | 10,0 |
| T ₇ | MS + 2,0 mg/L ⁻¹ BAP + 0,25 mg/L ⁻¹ ANA + 1200mg/L ⁻¹ Ampicilina | 25,0 ^c | 15,0 |

No entanto, Palú et al (2011) trabalhando com a descontaminação para propagação *in vitro* da figueira, verificou que a contaminação endógena dos explantes por bactérias foi um dos problemas diagnosticados. Ao realizar testes com diferentes antibióticos (clorafenicol, ampicilina sódica, ácido nalidídico, cefaloxina sódica, tetraciclina e norfloxacina), observou que o antibiótico ampicilina sódica proporcionou



mais de 90% de descontaminação, contrariando os resultados encontrados no experimento com o curauá.

Araújo (2012), trabalhando com segmentos caulinares de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh, observou que a eficiência dos antibióticos utilizados foi dependente da concentração utilizada, sendo que os melhores resultados, 100% de controle da contaminação, foram obtidos com a adição do antibiótico cloranfenicol ao meio de cultura e à medida que foi adicionando o cloranfenicol ao meio de cultura a contaminação reduziu até a dose de 200 mg/L⁻¹, a partir daí todas as doses resultaram no controle total da contaminação. Porém, à medida que aumentou a concentração de antibiótico foi observado o maior percentual de explantes oxidados. Para esse parâmetro, os resultados estão de acordo com o apresentado no processo de descontaminação do curauá quando utilizado as dosagens mais elevadas de ampicilina. Outro antibiótico utilizado neste experimento foi a ampicilina com eficiência no controle da ocorrência de contaminação bacteriana, em todas as doses testadas, sendo que na concentração de 600 mg/L⁻¹ o controle da contaminação foi total.

No entanto, considerando-se que no tratamento em que foi utilizado 100 mg/L⁻¹ de ampicilina foi observada 98% de descontaminação e elevada sobrevivência dos explantes (50%). Araújo et al (2012), também trabalhando com a desinfestação de segmentos caulinares de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh, testou diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e os tempos de imersão, obteve interação significativa entre as concentrações de hipoclorito de sódio e os tempos de imersão para a variável porcentagem de explantes contaminados. A maior porcentagem de desinfestação (100%) foi obtida quando os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 % de cloro ativo, por 20 minutos. Porém, foi observado que quanto maior o tempo de exposição dos explantes na solução desinfetante, maior foi a porcentagem de oxidação.

No entanto, Pereira et al (2003), testaram diferentes antibióticos no controle da contaminação *in vitro* de gemas axilares de batata (*Solanum tuberosum*), observaram que entre os doze antibióticos testados, os melhores

resultados foram proporcionados pelo uso da ampicilina e cloranfenicol. Resultados semelhantes aos obtidos no experimento trabalhado por ARAUJO (2012), no qual ampicilina e o cloranfenicol mostraram ser mais efetivos no controle da contaminação bacteriana *in vitro*, porém, a ampicilina foi o único antibiótico que não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes, ou seja, não apresentou problema com oxidação contrariando os resultados ocorridos com o experimento do curauá.

No experimento com o curauá há discordância de resultados quando comparados com a micropropagação de outras espécies, quanto à utilização da ampicilina no processo de descontaminação relacionado à oxidação, o que não ocorreu com a gentamicina. Porém, PEREIRA et al (2014), trabalhando com a micropropagação de bananeira 'Thap maeo', utilizando ampicilina sódica e cloranfenicol, nas concentrações de 15 e 20 mg L⁻¹ de ampicilina sódica e cloranfenicol, observaram aumento na porcentagem de oxidação atingindo as taxas de 52 e 64% respectivamente, porém sem ocasionar a morte dos explantes. Esse resultado vem corroborar com os resultados encontrados nos estudos de micropropagação com as gemas de curauá. A ocorrência do aumento do processo de oxidação pode estar ligada ao princípio ativo desses antibióticos. No entanto, chama-se atenção quanto à necessidade de mais estudos relacionados à utilização de diferentes tipos de antibióticos e desinfetantes, com diferentes dosagens e diversos tempos de imersão respectivamente na micropropagação de *Ananas erectifolius*.

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos chega-se à conclusão que se faz necessário mais estudos e pesquisas quanto à desinfestação dos explantes de *Ananas erectifolius* inclusive sobre a identificação dos microrganismos endofíticos, possibilitando a utilização de antibióticos específicos, com diferentes concentrações para a descontaminação dos explantes relacionados a esses microrganismos e, selecionar os antibióticos e desinfetantes com diferentes dosagens e diversos tempos de imersão para a desinfestação dos explantes e uso no meio de cultivo para micropropagação dessa espécie.



Biotecnologia

Agradecimentos

Os autores agradecem à Superintendência da Zona Franca de Manaus – SUFRAMA e ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO pelo apoio a esta pesquisa.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O (s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências Bibliográficas

ARAUJO, C. R. Cinética de decomposição térmica de compósitos poliméricos com fibras de curauá. Tese (Doutorado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2003. 220 p.

ARAÚJO, M. DA C. ROCHA; CASTRO, A. de; CHAGAS, E. A.; SILVA, L. M. da; CANEIRO, M.A.; FLORES, P. S. Uso de Antibióticos no controle da contaminação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura-Bento Gonçalves-RS, 2012.

PEREIRA, G. A.; BO JLIANI, A. C.; JUNIOR, E. F. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira "Thap maeo". **Ceres** no. 3. Viçosa. MG, Brasil, 2014.

SILVA, T. A. L.; TAMBOURGI, E. B. Estudo da Estabilidade da Enzima Bromelina Extraída do Curauá roxo (*Ananas erectifolius*). **Scientia Plena**, v. 7. n.1. UEC, Faculdade de Engenharia Química. Campinas-SP, Brasil. 2011

CORDEIRO, I. C.; DA SILVA, I. M.; Avaliação econômico-financeira da cultura de curauá (*Ananas comosus* var. *Erectifolius* (l. B. Smith) Coppus & Leal: um estudo de caso no município de Santo Antônio do Tauá, estado do Pará. Belém-PA, Brasil, UEPA,2008.

CORRÊA, R. M.; NASCIMENTO, C. W. A. DO; SOUZA, S. K. DO S.; FREIRE, F. J.; SILVA, G. B. da. Gafsa rock phosphate and triple superphosphate for dry matter production and Puptake by corn. **Scientia Agrícola, Piracicaba**, 2009, vol.62, n.2, pp. 159-164.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS O. F.; MENEZES, I. C. de PINTO, J. E. B. P. Cultura de tecidos (manual). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66). 2000. 41p.

LEDO, I. A. de M. O cultivo do curauá no Lago Grande da Franca. Belém: Banco de Crédito da Amazônia S.A. 1967, 23p.

PALÚ, E. G.; CORREA, LS, SUZUKI NA, BOLIANI, AC. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. 2003. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043.