

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Curso de Bacharelado em Biotecnologia

Estabelecimento *in vitro* de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels)

Lizandro Medeiros

Dourados - MS

2013

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Curso de Bacharelado em Biotecnologia

Estabelecimento *in vitro* de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels)

Lizandro Medeiros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani.

Dourados - MS

2013

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Curso de Bacharelado em Biotecnologia

Estabelecimento *in vitro* de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels)

Lizandro Medeiros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

Prof^a.Dr^a.Liliam Silvia Candido

Prof^a.Msc. Fernanda Pinto

Apresentado em: __ / __ / __

Conceito: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível.

Agradeço aos meus pais, Lizandro e Simoni, ao meu irmão, Matheus, e a minha namorada, Natalí, por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem em todas as minhas decisões.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Roberta Damiani, por ser minha orientadora em meu Trabalho de Conclusão de Curso, por sua disponibilidade e paciência, no incentivo necessário que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Liliam Silvia Candido e a Prof^ª. Msc. Fernanda Pinto, por aceitarem participar da banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, por sua disponibilidade.

Agradeço aos professores do Curso de Biotecnologia e Ciências Biológicas que ajudaram a construir o conhecimento que hoje possuo.

Agradeço aos acadêmicos da primeira turma de Biotecnologia e futuros colegas de profissão, por terem feito parte não só desses quatro anos de estudo, mas também pelos laços de amizade criados.

Agradeço a todos os meus amigos por sempre me apoiarem e estarem junto de mim nos momentos bons e ruins, fazendo-me seguir em frente, tenho por todos vocês um carinho especial.

Agradeço as companheiras de pesquisas Thalita, Taiza e Cristiane pela disponibilidade e troca de informações relevantes para o aprendizado aos conhecimentos inerentes à pesquisa.

Agradeço em especial aos amigos Vinicius, Taísa e Samed, por além de serem ótimos companheiros ainda se disponibilizaram a ajudar certos afazeres durante a elaboração da pesquisa.

Muito obrigado a todos vocês!

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. JAMELÃO (<i>Sygygium cumini</i> (L) SKEELS).....	13
2.2. CULTURA DE TECIDOS	18
2.3. CONTAMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	21
2.4. OXIDAÇÃO FENÓLICA.....	22
3. OBJETIVO.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. EXPERIMENTO 1: Efeito do tempo de desinfestação e do tipo de desinfestante no estabelecimento <i>in vitro</i> de jamelão.....	24
4.2. EXPERIMENTO 2: Efeito do carbendazim no estabelecimento <i>in vitro</i> de jamelão.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÕES.....	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem de contaminação fúngica em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.....27
- Tabela 2.** Porcentagem de contaminação bacteriana em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 201329
- Tabela 3.** Porcentagem de oxidação dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 201330
- Tabela 4.** Porcentagem de sobrevivência dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.....30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentagem de contaminação fúngica em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.....32
- Figura 2.** Porcentagem de contaminação bacteriana em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 201333
- Figura 3.** Porcentagem de oxidação dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.....34
- Figura 4.** Porcentagem de sobrevivência dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 201335

LISTA DE ANEXOS

Figura 5: Explantes caulinares de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels), tratados com diferentes concentrações de carbendazim, aos 14 dias de estabelecimento *in vitro*.....45

Figura 6: Explantes caulinares de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels), tratados com peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio em diferentes tempos de desinfestação, aos 14 dias de estabelecimento *in vitro*.....46

RESUMO

O jamelão ou jambolão (*Syzygium cumini* (L) Skeels) é uma importante espécie frutífera, pertencente a família Myrtaceae, sendo de ampla distribuição geográfica. A espécie apresenta amplo potencial econômico, porém de baixa utilização em sistemas de produção, inviabilizado por sua alta perecibilidade e falta de estudos no desenvolvimento de técnicas de propagação da espécie. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para assepsia e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de jamelão buscando o desenvolvimento de uma técnica alternativa para a obtenção de mudas da espécie. Os trabalhos foram conduzidos na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados – MS. O material vegetal utilizado foi coletado de plantas cultivadas no viveiro comercial “Mudas Gran Dourados Ltda.” localizado em Dourados – MS, em 2012. Para atingir os objetivos propostos foram avaliados diferentes agentes desinfestantes com o intuito de controlar a contaminação *in vitro*. No primeiro experimento avaliou-se o efeito de dois agentes químicos (hipoclorito de sódio a 2,5% e peróxido de hidrogênio a 10%), em dois diferentes tempos de exposição (10 e 20 minutos). Posteriormente, realizou-se um segundo experimento onde avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do fungicida carbendazim (0 - controle, 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹). As variáveis analisadas foram porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, porcentagem de explantes oxidados e porcentagem de sobrevivência dos explantes. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que explantes de jamelão tratados com peróxido de hidrogênio por 10 minutos apresentam maior porcentagem de sobrevivência do que àqueles tratados com hipoclorito de sódio pelo mesmo tempo. O tratamento promove um aumento da sobrevivência dos explantes de jamelão diretamente proporcional ao aumento da concentração do fungicida.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Myrtaceae, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, carbendazim.

ABSTRACT

The jambul (*Syzygium cumini* (L) Skeels) is an important fruit species belonging to the family Myrtaceae, being widely distributed geographically. The species has a broad economic potential, but low use in production systems, prevented by its high perishability and lack of studies on the development of techniques to propagate the species. Therefore, this study aimed to establish a protocol for disinfection and *in vitro* establishment of jambul shoot explants seeking to develop an alternative technique to obtain seedlings of species. The plant material was collected from plants grown in the nursery trade “Mudas Gran Dourados Ltda.” Dourados – MS, in 2012 and trials were carried out in Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados - MS. To achieve the proposed objectives we evaluated different disinfectant agents in order to control *in vitro* contamination. In the first experiment we evaluated the effect of two chemical agents (sodium hypochlorite at 2.5% and hydrogen peroxide at 10%) in two different exposure times (10 and 20 min). Subsequently, a second experiment was performed and evaluated the effect of different fungicide carbendazim concentrations (0 - control, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 75 mg L⁻¹ and 100 mg L⁻¹). The variables were the percentage of fungal and bacterial contamination, percentage of explants oxidized and survival percentage of explants. From the obtained results it can be concluded that jambul explants treated with hydrogen peroxide for 10 minutes have a higher percentage of survival than those treated with sodium hypochlorite at the same time. The treatment promotes increased survival of explants jambul increased proportionally to the fungicide concentration.

Key-words: Tissue culture, Myrtaceae, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, carbendazim.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor mundial de frutas com 43,164 milhões de toneladas produzidas em uma área de 2,179 milhões de hectares no decorrer do ano de 2010, ficou atrás apenas de China e Índia no cenário mundial, o que representa um aumento de 5,17% a mais que em 2009, quando chegou a 41,041 milhões de toneladas. Produção esta direcionada a frutas tropicais, subtropicais e temperadas, possibilitado devido a grande extensão territorial do país, aliada a sua posição geográfica com distintas variações climáticas e de solo. Atualmente são exploradas cerca de quinhentas variedades de espécies frutíferas e outras duzentos e vinte de frutíferas nativas somente da região Amazônica (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2011).

As espécies frutíferas, como as pitangueiras, goiabeiras, jaboticabeiras entre outras, podem ser de extrema importância para o âmbito de geração de empregos e/ou renda adicional à pequenos produtores rurais buscando novidades e fornecendo novas alternativas ao mercado. Porém, o conhecimento existente sobre a maioria destas plantas, ainda são escassos, o que torna este preceito vago, sendo utilizado apenas por quem obteve informações de gerações anteriores por conhecimento popular, tornando assim os estudos com estas plantas de extrema importância para a cadeia produtiva nacional, com o desenvolvimento de novas técnicas, manejos, cultivos, entre outros.

Dentre as regiões tropicais pode-se destacar o Cerrado pela formação de um complexo de biomas, constituída pelo Cerradão (bioma das Florestas Estacionais), pelas Savanas e Campos Tropicais (BATALHA, 2011), abrangendo aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados e correspondendo a aproximadamente 23,1% do

território brasileiro, inserindo uma das maiores biodiversidades do planeta (MARTINOTTO et al., 2007).

Desta enorme biodiversidade, destacam-se diversas espécies de alto potencial econômico incentivados pela pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias, muitas destas pertencentes à família Myrtaceae com aproximadamente 3500 espécies distribuídas em 100 gêneros, dos quais apenas quatro são de importância econômica e/ou incorporadas ao hábito alimentar, *Eugenia*, *Acca*, *Psidium* e *Myrciaria* (MANICA, 2002), além de outras pouco conhecidas, com excelentes fontes de minerais, vitaminas e antioxidantes e que poderiam ser incorporadas na alimentação, como exemplo o Jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels) (ALBERTON et al., 2001). Espécies pouco exploradas ou utilizadas devida sua escassez ou ausência de estudos que revelem seus conteúdos orgânicos e minerais simultaneamente à sua propagação e podendo assim, viabilizar um direcionamento perante sua utilidade (LORENZI, 1992).

O gênero *Syzygium*, pertencente à família das Myrtaceae, estando proximamente relacionado ao gênero *Eugenia*, incluído na subfamília Myrtoideae (frutos carnosos), compreende cerca de 500 espécies, de ampla distribuição, muitas das quais são abundantes em óleos essenciais e taninos, o que as tornam importantes fontes de pesquisas e utilização medicinal e farmacêutica onde estão incluídos o jamelão (LATTUADA, 2010).

O jamelão destaca-se como uma árvore frutífera, nativa da Índia, presente nos trópicos e de ampla distribuição em diversas regiões do mundo, sendo encontrada no território brasileiro, principalmente na região Sudeste, além de alguns estados da região Norte, Nordeste e Centro-Oeste (DANADIO et al., 1998). As plantas de jamelão geralmente são utilizadas como plantas ornamentais, devido a sua folhagem brilhante e utilizadas em arborização urbana, porém é pouco indicada pelo fato de seus frutos

provocarem manchas em veículos, calçadas, mãos, tecidos entre outros, devido sua alta perecibilidade (SA, 2008).

O jamelão é propagado normalmente por sementes, o que acarreta variabilidade nas plantas descendentes, aliado a um desenvolvimento lento e baixa taxa de germinação, implicando em um problema quando o objetivo é a formação de pomar comercial (LORENZI, 2000), assim como a crescente aplicação a novos estudos de desenvolvimento de plantas nativas, aliado ao desmatamento e extinção de espécies, faz-se necessário o estudo de novos métodos de produção destas plantas, onde o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa para a propagação da espécie (MARTINOTTO et al., 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels)

O jamelão ou jambolão é uma árvore nativa das regiões dos trópicos, particularmente da Índia, Filipinas, Madagascar e Tailândia (MIGLIATO et al., 2006). A planta foi introduzida em muitos países tropicais pertencentes à África e à América Latina, podendo também ser localizado em algumas regiões subtropicais como Flórida, Califórnia, Argélia e Israel (SA, 2008). No Brasil, encontra-se em diversos estados das regiões sudeste, centro-oeste, nordeste e norte (DANADIO et al., 1998).

A espécie *Syzygium cumini* apresenta várias sinonímias científicas, dentre elas: *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium jambolanum* D.C., *S. caryophyllifolium* D.C., *Eugenia cortisona* Lour., *E. frondosa* Wall., *E. caryophyllifolia* Lam., *E. jambolifera* Roxb., *E. moorei* Muell., *E. obtusifolia* Roxb., *E. cumini* Druce, *Jambolifera pedunculata* Gaertn, *E. glomerata* Sieber, *Calyptranthes caryophyllifolia* Willd, *C. jambolana* Willd, *C. cumini* Pers. e *Myrtus cumini* L (MIGLIATO et al., 2006).

Esta planta é popularmente conhecida nos diversos países de sua ocorrência. No Brasil, pode ser encontrada com as seguintes denominações: jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva, jambolan, java plum, jamun, além de jamelão. Nos demais países é conhecida como malak rose-apple, jamblon, jambolana, jambol, jambul, purple plum, jambeiros dentre outros(MIGLIATO et al., 2006).

As árvores dessa espécie, perenifólia, são de grande rusticidade, lenhosas, apresentando um tronco com casca rugosa, de cor pardo-acinzentada depois pardo-escura e o caule aéreo ereto e cilíndrico, crescem rapidamente, porém necessitam de 40 anos para atingir seu tamanho máximo, de 15 a 20 metros de altura, e de 3 a 4,5 metros de diâmetro de projeção da copa, com ramificações caulinares do tipo simpodial e ramagem numerosa e reluzente, formando uma copa arredondada e densa, é amplamente utilizada em beira de estradas, parques, jardins e bosques, bem como cultivadas para quebra-vento e na beira de rios, tanques e açudes pelos frutos destinados aos peixes. Apesar de sua origem tropical, pode ser cultivada em todo território brasileiro, apreciadora de solos úmidos e calor, tornando-se subespontânea em muitas regiões (LORENZI et al., 2003).

Os ramos retorcidos apresentam folhas simples, dispostas em filotaxia oposta, pecioladas, lanceoladas ou lanceoladas oblongas até elípticas, com margens onduladas, de nervação penínérvea, com nervura marginal, são aromáticas, de coloração verde-brilhantes, de 8 a 14 cm de comprimento por 3 a 5 cm de largura, com pecíolo de 1,5 a 2,5 cm (LORENZI et al., 2003).

As flores, hermafroditas, estão dispostas em inflorescências axilares, em panículas curtas com flores brancas, pequenas, racemosas, plurifloras compostas, com o pedúnculo principal e os pedicelos pouco retorcidos como ocorre nos ramos. No Brasil, as flores de jamelão são encontradas nos intervalos dos meses de setembro a novembro

e o fruto, encontrado nos meses de dezembro a fevereiro (ALBERTON et al., 2001; ALMEIDA et al., 1998; LORENZI et al., 2003).

Os frutos, tipo drupa, são periformes, lisos e pequenos, apresentando cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, de forma ovóide, tornando-se roxo escuro quando completamente maduros, sua pele é fina, lustrosa e aderente e sua polpa, também roxa, é carnosa e envolve um caroço único e grande, suculento com sabor ácido e adocicado, oferecendo forte sensação de adstringência (LAGO et al., 2006; LORENZI et al., 2003).

O jamelão é caracterizado por sua utilidade na medicina popular para fins terapêuticos como diurético, adstringente, cardiotônica, anti-hemorrágica, hipoglicemiante, hipotensiva, estimulante do sistema nervoso central, antimicrobiano, antiinflamatório, antipirética, antiescorbútica, anticonvulsivante, antiemética e carminativa. Assim é empregado popularmente no tratamento de úlcera venérea, disenteria, queimaduras, interrupção de hemorragia nas fezes, constipação, queimaduras, asma, retenção urinária, purificação do sangue, leucorréia, descamações do couro cabeludo, estomatite, gengivite e bronquite, dentre outros (SA et al., 2008). Sua coloração característica deve-se ao alto teor de pigmentos antociânicos, composto natural de ação antioxidante, podendo assim, equilibrar o sistema de defesa antioxidativo do organismo, inibindo a manifestação de diversas patologias, como câncer e artero esclerose (LAGO, et al., 2006).

Os medicamentos fitoterápicos quando utilizados adequadamente, apresentam efeitos terapêuticos, muitas vezes, superiores aos convencionais, sendo vantajoso ao paciente pelos efeitos colaterais minimizados, já que os medicamentos sintéticos apresentam excesso de efeitos colaterais, tornando-se, ineficientes ou inseguros,

resultando em riscos graves ao paciente, podendo gerar dependências (DEVIENNE, 2000).

Atualmente pode-se constatar diversos constituintes químicos em distintas estruturas da anatomia da espécie, sendo que, nos frutos foram encontrados antocianidinas, nas sementes, antimelanina, materiais resinosos, quercetina, taninos hidrolisáveis (elágico, corilágico, ácido gálico), glicose e diversos óleos essenciais, nas cascas pode-se encontrar triterpenóides, canferol, ácido acetiloleanólico, ácido elágico, quercetina, miricetina e isoquercetina, além de nas folhas também encontrar-se ácido gálico, ácido elágico, canferol, quercetina, miricetina, metilgalato, ácido mclorogênico e nilocitina, e nas flores pode ser encontrado ácido oleanólico. Estes estudos foram realizados a partir da utilidade intensa do jamelão na medicina popular dos frutos, cascas, sementes, flores e folhas, em forma *in natura*, de xaropes, chás, extratos, infusões e outros, estimulando assim diversas pesquisas científicas sobre a planta (MIGLIATO et al., 2006).

Grover et al. (2002) utilizaram o jamelão em pesquisas sobre caracterização de efeito hipoglicêmico no tratamento de *diabetes mellitus*, a administração oral, em ratos, do extrato da polpa da espécie *S. cumini*, mostrou efeito hipoglicêmico em trinta minutos, mediado possivelmente pela secreção de insulina.

Migliato et al. (2006) utilizaram os extratos etanólicos dos frutos de *S. cumini* para avaliação de sua atividade antimicrobiana, empregando variadas concentrações e métodos extrativos, obtendo uma concentração mínima entre 1.250,0 µg/mL a 312,5 µg/mL.

Loguercio et al. (2005) avaliaram a existência de efeito antibacteriano de extrato hidro-alcoólico a 10% (m/v) de folhas de jamelão, identificando sua atividade

antibacteriana frente às amostras testadas, sem diferença de sensibilidade entre microrganismos Gram positivos e Gram negativos.

Mazzanti et al. (2003) verificou a eficiência do extrato aquoso da casca de *S. cumini* sobre os níveis glicêmicos e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano, já os resultados indicaram que o extrato da casca do jamelão não acarretou efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos pelo aloxano, sendo o efeito antioxidante da planta insuficiente para diminuir significativamente a produção de ácido tiobarbitúrico.

Blumenthal et al. (1998) pesquisaram a utilização do extrato da casca seca do tronco do jamelão, expressando a indicação no tratamento da diarreia e de inflamações com o uso do mesmo por vias de administração oral e tópica, veiculado em formas farmacêuticas diversas, sendo eficaz, no máximo em quatro dias.

Oliveira et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* relatando atividade contra *Candida krusei* cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Lago et al. (2006) pesquisaram formas produtivas de geléia de jamelão, com a elaboração e avaliação das características físico-químicas e sensoriais da geléia. A fruta apresentou a seguinte composição química: cinzas, 0,34%; lipídeos, 0,30%; proteínas, 0,67%; carboidratos, 10,07%; fibras, 0,28%; umidade, 87,75%; frutose, 0,4%; glicose, 0,6%; antocianinas totais, 0,276%; substâncias pécnicas, 0,245%; acidez titulável, 5,91%; sólidos solúveis, 9,00%; e pH, 3,9. Os resultados obtidos mostraram que o atributo cor foi o que mais agradou aos provadores, o atributo odor foi o menos apreciado. Em conclusão, o estudo de análise sensorial revelou uma aceitação satisfatória da geléia de jamelão.

Alcantara et al. (2010) avaliaram o efeito dos ácidos naftaleno acético (ANA) e indolilbutírico (AIB) no enraizamento de estacas de jamelão, em diferentes concentrações, obtendo como resultado ideal, uma concentração 1.000 mg.L^{-1} para ambos os fitorreguladores testados, e sendo a porcentagem de enraizamento ligeiramente superior para utilização de ANA (ácido naftaleno acético) quando comparada ao AIB (ácido indol butírico).

Perante a tendência atual, aliada ao interesse e incentivo renovado da utilização de fitoterápicos, a descoberta e conseqüentemente, a implementação de novos produtos terapêuticos originários de plantas silvestres, abrangem estudos ecléticos desde a nível cultural à laboratorial, para que assim seja finalmente apontada e identificada a natureza dos princípios ativos (MIGLIATO et al., 2006).

A propagação do jamelão que ocorre particularmente por via natural, por meio de sementes, porém, com baixa taxa de germinação, problema quando o objetivo é a formação de pomar comercial (LORENZI, 2000), assim, com o interesse medicinal sobre o mesmo, gerador de uma alta demanda de busca de informações perante as formas de propagação da espécie (ALCANTARA et al., 2010).

2.2. Cultura de Tecidos

Uma das técnicas mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais é a propagação *in vitro* ou micropropagação. Essa regeneração fundamenta-se na característica de totipotência da célula vegetal, a qual permite manifestar a capacidade de iniciar a formação de novo indivíduo, para a multiplicação em larga escala de variadas espécies nativas e frutíferas livres de patógenos, com herdabilidade plena dos caracteres da planta cultivada inicialmente, permitindo a formação de culturas homogêneas, geneticamente uniformes, viabilizando a produção vegetal quando há dificuldades nos mecanismos naturais de reprodução, ou nos casos de espécies ameaçadas de extinção,

com menor exigência de espaço físico, independentemente da época anual, acelerando as metodologias produtivas convencionais, visando seu desenvolvimento, assim como a obtenção de novos protocolos de pesquisa. 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 (HONDA et al., 2001; WALIA et al., 2003; GIRI et al., 2004; HIREGOUDAR et al., 2005; SANTOS e WENDLING, 2010).

A cultura de tecidos vegetais possibilita a multiplicação de plantas em condições fitossanitárias ideais, em ambiente controlado e espaço reduzido, independente da influência de fatores ambientais, sazonais e geográficos, ampliando as perspectivas de exploração econômica dessas espécies (BONGAERTS, 1998; SATO e YAMADA, 2008).

O cultivo de células vegetais pode ser feito via organogênese, ocorrendo diferenciação das raízes e brotações ao decorrer de seu desenvolvimento vegetal, ou ainda pela embriogênese somática onde é realizado o desenvolvimento de embriões através de células somáticas totipotentes (SOARES et al., 2007).

Para realizar uma micropropagação via organogênese, deve-se primeiramente fazer a seleção do explante, pequenos propágulos ou de fragmentos de tecidos e órgãos vegetais, desinfesta-lo e inseri-lo em meio de cultivo, sólido ou líquido, com suas demandas nutritivas necessárias, sais minerais, vitaminas e fitorreguladores, mantendo-os em condições assépticas. Posteriormente faz-se a multiplicação dos propágulos em meio de cultivo adequado, através de repetitivos subcultivos e seguidamente as partes aéreas produzidas são transferidas para outro meio de cultura, contendo reguladores de crescimento e seus indutores de raízes, onde após crescimento apropriado em cultivo *in*

vitro, são novamente transferidos para transplântio em substrato ou solo, já sob forma de mudas (MURASHIGE, 1974).

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 são sistemas mais indicados à produção de substâncias *in vitro* (TORRES et al., 2000).

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).

Como fitorreguladores destaca-se o uso de citocininas, entre os principais controladores da morfogênese *in vitro*, o 6-benzamilopurina (BAP), extremamente eficaz na multiplicação de diversas espécies, de suas partes aéreas e na indução das gemas adventícias e que podem ser associados quando necessário ao uso de giberelinas induzindo o alongamento celular, quando as brotações são pequenas e não podem ser individualizadas para crescimento (DZAZIO et al., 2002).

Na etapa de enraizamento, a maioria das plantas lenhosas apresentam grande dificuldade de estabelecimento, e para isso são utilizados as auxinas, para desenvolvimento específico destas raízes, sendo os mais utilizados os hormônios sintéticos ANA (ácido naftaleno acético) e o AIB (ácido indolbutírico), já que o AIA (ácido indolacético), auxina natural, é de baixa utilização devido ao seu elevado custo, e maior possibilidade de ocasionar efeitos fitotóxicos, porém pode ser utilizado em plantas de difícil enraizamento (DZAZIO et al., 2002).

2.3. Contaminação *in vitro*

Contaminações são um dos maiores problemas da cultura de células e tecidos de plantas (LEIFERT e CASSELLS, 2001). 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). Os contaminantes podem ser introduzidos com os explantes, por ocasião do seu estabelecimento *in vitro* (CAMARA et al., 2010).

A princípio todas as espécies de fungos, leveduras e algumas bactérias representam risco severo para a cultura de tecidos de plantas, porque elas crescem bem nos meios de cultura para tecidos vegetais e podem matar os explantes, por causa da redução do pH do meio, da produção de metabólitos tóxicos e da competição por nutrientes (LEIFERT e WAITES, 1994). Por isso o estabelecimento de um protocolo de esterilização superficial dos explantes é essencial no cultivo *in vitro* de plantas.

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 (CaOCl₂) com teor de cloro ativo que pode variar de 2,0% a 2,5%. Um espalhante adesivo é utilizado a exemplo do Tween® 80 (1 a 2 gotas/100 mL) nas soluções à base de cloro para aumentar a penetração dos agentes desinfestantes no tecido vegetal. No entanto esse processo convencional de assepsia pode não ser suficiente para eliminar completamente os microrganismos contaminantes, nesse caso outros agentes antimicrobianos podem ser utilizados como antibióticos, fungicidas, cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio e peróxido de hidrogênio (PASQUAL, 2001).

Os agentes antimicrobianos podem ser utilizados de maneira associada ou não, adicionados ao meio de cultura ou em soluções preparadas para a imersão dos explantes

(SCHERWINSKI-PEREIRA e COSTA, 2010). 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).

2.4. Oxidação fenólica

Na micropropagação outro fator que deve ser levado em consideração além da contaminação *in vitro* é a oxidação fenólica. A ocorrência de oxidação pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro* (BASSAN et al., 2006).

O processo de oxidação no cultivo *in vitro* pode ser desencadeado por injúrias causadas aos tecidos vegetais, como o corte dos explantes com bisturi (CID e TEIXEIRA, 2010) ou devido à utilização de agentes químicos na esterilização superficial. O tecido lesionado libera compostos fenólicos que em contato com as enzimas polifenoloxidasas oxidam os polifenóis formando as quinonas. As quinonas são substâncias altamente ativas e, posteriormente à sua produção, polimerizam e ou oxidam proteínas para formar compostos melânicos, os quais são responsáveis pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultura (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). O acúmulo de polifenóis e de produtos da oxidação modificam a composição do meio e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000), inibindo o crescimento e podendo causar a morte dos explantes (SATO et al., 2001).

No estabelecimento *in vitro* de plantas lenhosas, observa-se diversas dificuldades, podendo estar correlacionados aos processos regulatórios de crescimento, principalmente as auxinas, que conforme a concentração endógena, resulta em indução dos mesmos, além de plantas lenhosas ainda acumularem polifenóis e produtos oxidativos, como a lignina, calose, cutina, melanina e suberina ao redor da superfície

excisada, modificando a absorção dos metabólitos e a composição do meio de cultivo, sendo estes fatores minimizados pelo uso de pré-tratamentos a planta doadora do explante determinadas no processo de estabelecimento *in vitro*.

Outras dificuldades estão explícitas pela contínua infecção de microrganismos, já que seu desenvolvimento ocorre em campo aberto durante muitos anos, tornando-se difícil o controle de desinfecção acarretando em novos problemas como danos e até morte do tecido (ANDRADE et al., 2000).

Estas contaminações ainda podem ser minimizadas ou até mesmo escassas, através da manutenção adequada da planta-mãe em casa de vegetação favorecendo a ação de fungicidas e bactericidas e sendo facilitada pelo trabalho com plântulas já germinadas sob condições assépticas, já que o nível de contaminação é considerado maior quando estas plantas matrizes dos explantes são oriundas do campo. Porém até mesmos as plantas matrizes provenientes de casa de vegetação, submetidas a rigoroso controle fitossanitário, são fontes potenciais de microrganismos, limitando-as em cultivo *in vitro* (ANDRADE et al., 2000).

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo estabelecer um protocolo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* na produção de explantes de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels).

No âmbito de se atingir o objetivo proposto foram avaliados diferentes agentes desinfestantes com o intuito de controlar a contaminação *in vitro* do material vegetal. No primeiro experimento avaliou-se o efeito de dois agentes químicos desinfestantes (hipoclorito de sódio a 2,5% e peróxido de hidrogênio a 10%), em dois distintos tempos de exposição (10 e 20 minutos). Posteriormente, realizou-se um segundo experimento

onde avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do fungicida carbendazim (0 - controle, 25 mg.L-1, 50 mg.L-1, 75 mg.L-1, 100 mg.L-1) no melhor controle da contaminação e em decorrência melhor estabelecimento, sobrevivência dos explantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram desenvolvidos dois experimentos durante o ano de 2012, nos Laboratórios de Botânica e Multiuso da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados - MS.

O material vegetal utilizado foi obtido de ramos vegetativos jovens, coletados de plantas de jamelão com aproximadamente quatro anos de idade, oriundos de plantas cultivadas no viveiro comercial “Mudas Gran Dourados Ltda.” localizado no município de Dourados – MS. Em ambos os experimentos, o preparo dos explantes consistiu na secção dos ramos vegetativos em segmentos nodais com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, mantendo-se duas gemas laterais sem a presença de folhas.

4.1. Experimento 1: Efeito do tempo de desinfestação e do tipo de desinfestante no estabelecimento *in vitro* de jamelão.

Nesse experimento, os fatores estudados foram o tempo de desinfestação (10 e 20 minutos) e o tipo de desinfestante (hipoclorito de sódio a 2,5% e peróxido de hidrogênio a 10 % de princípio ativo), obtendo-se assim um fatorial 2x2, totalizando 4 tratamentos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de 4 repetições e cada repetição constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada.

A esterilização superficial dos ramos vegetativos foi realizada em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 1 minuto e seguido dos respectivos tratamentos adicionados de uma gota de Tween® 80 para cada 500 mL de solução. Após os

tratamentos, o material vegetal foi lavado por 3 vezes com água estéril. Ao término do processo de desinfestação os explantes foram preparados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e MCCOWN, 1980). O meio de cultura foi previamente preparado, sendo acrescido de 5,0 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 6 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,8 (ajustado antes da adição do Agar) e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, submetidos a um período de escuro de 7 dias e após este período, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram realizadas aos 14 dias após a inoculação dos explantes e as variáveis analisadas foram: porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de contaminação bacteriana, porcentagem de explantes oxidados e porcentagem de sobrevivência dos explantes.

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

4.2. Experimento 2: Efeito do carbendazim no estabelecimento *in vitro* de jamelão.

Nesse experimento o fator estudado foi o tempo de diferentes concentrações do fungicida carbendazim (25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) além do controle (ausência de fungicida, usando somente água destilada), totalizando 5 tratamentos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de 4 repetições e cada repetição constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada.

Os tratamentos foram realizados através da imersão dos ramos vegetativos por 2 horas antes do estabelecimento *in vitro*. Após cada tratamento realizou-se a retirada de folhas (toalete) e realizou-se o procedimento de assepsia com solução de peróxido de hidrogênio (10%) durante 20 minutos, seguido de 3 lavagens com água estéril. Ao término do processo de desinfestação os explantes foram preparados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e MCCOWN, 1980). O meio de cultura foi previamente preparado, sendo acrescido de 5,0 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 6 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,8 (ajustado antes da adição do Agar) e autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, submetidos a um período de escuro de 7 dias e após, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram realizadas aos 14 dias após a inoculação dos explantes e as variáveis analisadas foram: porcentagem de contaminação fúngica, porcentagem de contaminação bacteriana, porcentagem de explantes oxidados e porcentagem de sobrevivência dos explantes.

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média geral de contaminação fúngica dos explantes foi de 94,5% demonstrando que o uso dos agentes desinfestantes peróxido de hidrogênio (10%) e hipoclorito de sódio (2,5%), nos tempos de desinfestação testados (10 e 20 minutos) foram ineficientes no controle desta variável (Tabela 1). Uma alternativa para amenizar esse problema pode ser aumentar o tempo de exposição dos explantes aos agentes desinfestantes, entretanto, sabe-se que quanto maior o tempo de exposição do explante ao agente desinfestante, maior o percentual de oxidação dos mesmos. O cloro, principal componente do hipoclorito, quando liberado em meio aquoso produz ácido hipocloroso, o qual tem como característica, elevado poder oxidante (PASQUAL, 2001). Da mesma forma, o peróxido de hidrogênio, é um dos oxidantes mais versáteis que existe, sendo superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio, através de catálise, H₂O₂ pode ser convertido em radical hidroxila (\bullet OH) com reatividade inferior apenas ao flúor (MATTOS et al., 2003).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação fúngica em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

<i>Desinfestante</i>	<i>Tempo de desinfestação (min)</i>	
	10	20
Hipoclorito de sódio (2,5 %)	100 a A	96,9 a A
Peróxido de hidrogênio (10 %)	90,6 a A	90,6 a A
Média geral (%)	94,5	
CV (%)	8,3	

* Médias seguidas por letras iguais (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Em segmentos caulinares de camu-camuzeiro (*Myrciaria dúbia* (H.B.K) McVough) Araujo et al. (2012) constataram uma maior porcentagem de desinfestação (100%) quando os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 %

de cloro ativo, por 20 minutos. Porém, os mesmos autores observaram que quanto maior o tempo de exposição dos explantes na solução desinfestante, maior a porcentagem de oxidação e menor a porcentagem de estabelecimento dos explantes.

O efeito benéfico da redução do tempo de exposição ao agente desinfestante foi observado por Moraes et al. (2007), onde os autores verificaram que a concentração de 2% de hipoclorito de sódio, durante 10 minutos, proporcionou menor contaminação e maior sobrevivência de gemas axilares de abacaxizeiro. Por outro lado, é importante salientar que o fator tempo de exposição ao agente desinfestante é variável com a espécie estudada e tipo de explante utilizado (estágio de crescimento e grau de lignificação).

Com relação à contaminação fúngica e baseando-se na comparação das médias dos resultados obtidos, os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Para a variável contaminação bacteriana, embora não tenha-se verificado diferença significativa entre o agente desinfestante e o tempo de exposição, foi observado uma baixa porcentagem de contaminação, obtendo-se uma média geral de 7,8% (Tabela 2), um valor relativamente baixo se comparado à contaminação fúngica. Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro et al. (2000). Os mesmos autores observaram níveis de contaminação bacteriana inferiores a 30% em explantes de banana tratados com hipoclorito de sódio, porém o mesmo tratamento não foi eficiente no controle da contaminação fúngica.

Tabela 2. Porcentagem de contaminação bacteriana em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

<i>Desinfestante</i>	<i>Tempo de desinfestação (min)</i>	
	10	20
Hipoclorito de sódio (2,5 %)	6,3 a A*	6,3 a A
Peróxido de hidrogênio (10 %)	3,1 a A	15,6 a A
Média geral (%)	7,8	
CV (%)	109,9	

* Médias seguidas por letras iguais (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Em relação à oxidação dos explantes (Tabela 3) foi observado uma média geral de 42,2%, o que representa um elevado percentual de oxidação dos explantes, independentemente do tratamento realizado, pois estes não diferiram estatisticamente. De acordo com Vizzotto e Fetter (2009) o jambolão apresenta alguns importantes compostos secundários, como exemplo, flavonóides (antocianinas, quercetina, rutina e mirecetina) e taninos hidrolisáveis. Os taninos (polifenóis) são substâncias frequentemente encontradas em grande quantidade em espécies da família Myrtaceae (FACHINELLO et al., 2005). Durante a preparação dos explantes para o estabelecimento *in vitro*, o corte causa a liberação destes compostos, os quais, em contato com o meio, são oxidados pelas enzimas polifenases produzindo substâncias tóxicas e inibindo o crescimento dos explantes (OLIVEIRA et al., 2007). A oxidação dos polifenóis leva a produção de substâncias de composição complexa, como as quinonas, que, de acordo com Teixeira (2001), podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula.

Tabela 3. Porcentagem de oxidação dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

<i>Desinfestante</i>	<i>Tempo de desinfestação (min)</i>	
	10	20
Hipoclorito de sódio (2,5 %)	53,1 a A*	31,3 a A
Peróxido de hidrogênio (10 %)	43,8 a A	40,6 a A
Média geral (%)	42,2	
CV (%)	45,5	

* Médias seguidas por letras iguais (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Quanto a sobrevivência dos explantes verificados pela coloração verde dos explantes de jamelão (Tabela 4) verificou-se que o tratamento com peróxido de hidrogênio por 10 minutos proporcionou maior porcentagem de sobrevivência em relação aos tratados com hipoclorito de sódio pelo mesmo tempo, de acordo com o teste de Duncan a 5%. A sobrevivência dos explantes está diretamente relacionada à redução da oxidação e da contaminação por microrganismos. Outro fator a ser considerado é com relação ao tempo de exposição ao agente desinfestante. De acordo com Nietzsche (2006) quanto maior o tempo de imersão ao desinfestante, maior a probabilidade de ocorrer uma desidratação dos explantes, causando a morte dos mesmos.

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do desinfestante e tempo de desinfestação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

<i>Desinfestante</i>	<i>Tempo de desinfestação (min)</i>	
	10	20
Hipoclorito de sódio (2,5 %)	6,3 a A*	28,1 a A
Peróxido de hidrogênio (10 %)	31,3 a A	34,4 a A
Média geral (%)	25	
CV (%)	55,3	

* Médias seguidas por letras iguais (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Com relação à contaminação fúngica (Figura 1), independentemente da concentração de carbendazim utilizada, verificou-se um elevado percentual de contaminação, totalizando 98,8% (média geral) de explantes contaminados, em um coeficiente de variação de 4,2%, como ilustra a figura 1. De acordo com Scherwinski-Pereira e Costa (2010), dentre os fungicidas sistêmicos, o mais importante grupo utilizado comercialmente são os benzimidazóis, e, está incluído neste grupo o carbendazim. O sítio primário de ação dos benzimidazóis é a tubulina, proteína que constitui os microtubulos. Quando esta proteína entra em contato com o fungicida, a formação dos microtubulos é inibida e as células dos fungos não se dividem, passando a ser multinucleadas, levando o fungo à morte. Entretanto, nenhuma das concentrações avaliadas (25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) nesse trabalho foi eficiente no controle desta variável.

Diferentemente dos resultados verificados neste experimento, Nietsche (2006) testaram duas concentrações do fungicida carbendazim, respectivamente, 3,3% e 6,6%, em explantes de bananeira (*Musa spp.* cv. Prata Anã) tratados por imersão e verificaram que estas concentrações apresentam 100% de controle da contaminação por fungos, e, não afetam o desenvolvimento dos explantes.

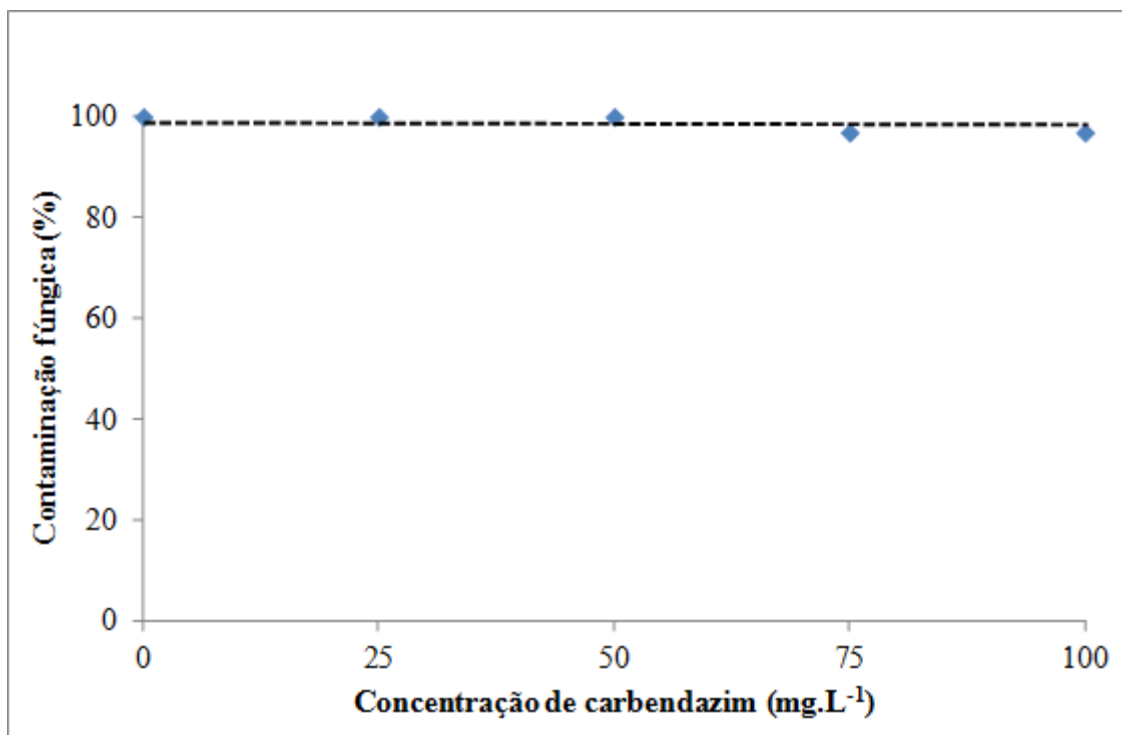


Figura 1. Porcentagem de contaminação fúngica em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

Para a variável contaminação bacteriana, pode-se destacar um baixo percentual de contaminação, quando comparado à contaminação fúngica, com uma média geral de 11,3%, porém semelhante à contaminação fúngica, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2). De acordo com Caldas e Taketomi (1993) o uso de soluções antifúngicas só é efetivo no controle da contaminação bacteriana se associado a tratamentos com antibióticos. Em pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), uma espécie também da família Myrtaceae, Lattuada (2010) utilizando o agente bactericida tetraciclina na concentração de 60 mg.L⁻¹ e a combinação desta com o fungicida Benomyl[®] (2g.L⁻¹), obteve resultados positivos com o tratamento da planta matriz, onde nenhuma contaminação foi verificada.

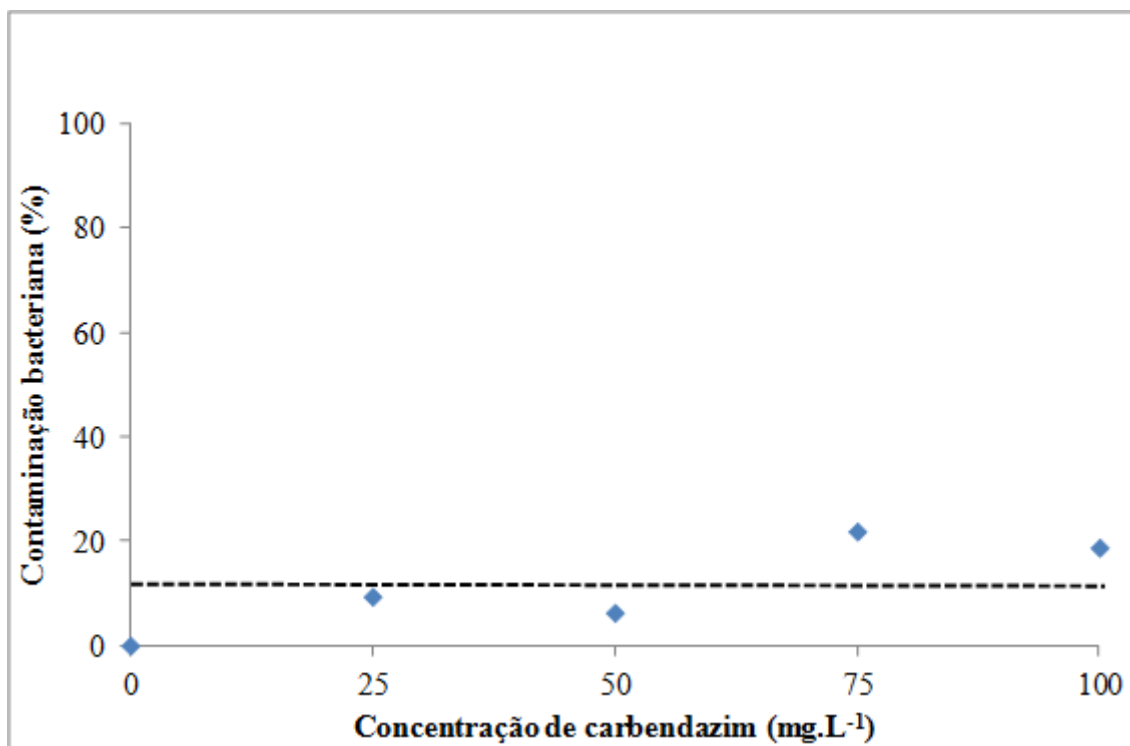


Figura 2. Porcentagem de contaminação bacteriana em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

Quanto à oxidação dos explantes (Figura 3), obtve-se uma média geral de 17,5% neste experimento, média esta considerada relativamente baixa se comparada a outras espécies da família Myrtaceae, como exemplo em pitangueira, onde foi verificado por Lattuada (2010) que o tratamento com tetraciclina (bactericida) e tetraciclina + Benomyl[®] (fungicida) causaram um elevado percentual de oxidação, respectivamente, 75 e 85%. Semelhante aos resultados obtidos por Lattuada (2010), Borges et al. (2011) observaram maior incidência de oxidação, quando adicionado fungicida ao meio de cultura, no estabelecimento *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* Tull, inviabilizando o estabelecimento dos explantes.

Julliatti (2002) afirma que alguns fungicidas podem ser indutores de resistência, estimulando o sistema de defesa da planta, produzindo fitolexinas e compostos fenólicos que são letais a diferentes patógenos, mas, como consequência, levam a

oxidação dos explantes. Porém deve-se constatar que não houve uma diferença significativa entre as distintas concentrações de carbendazim testadas e a solução controle.

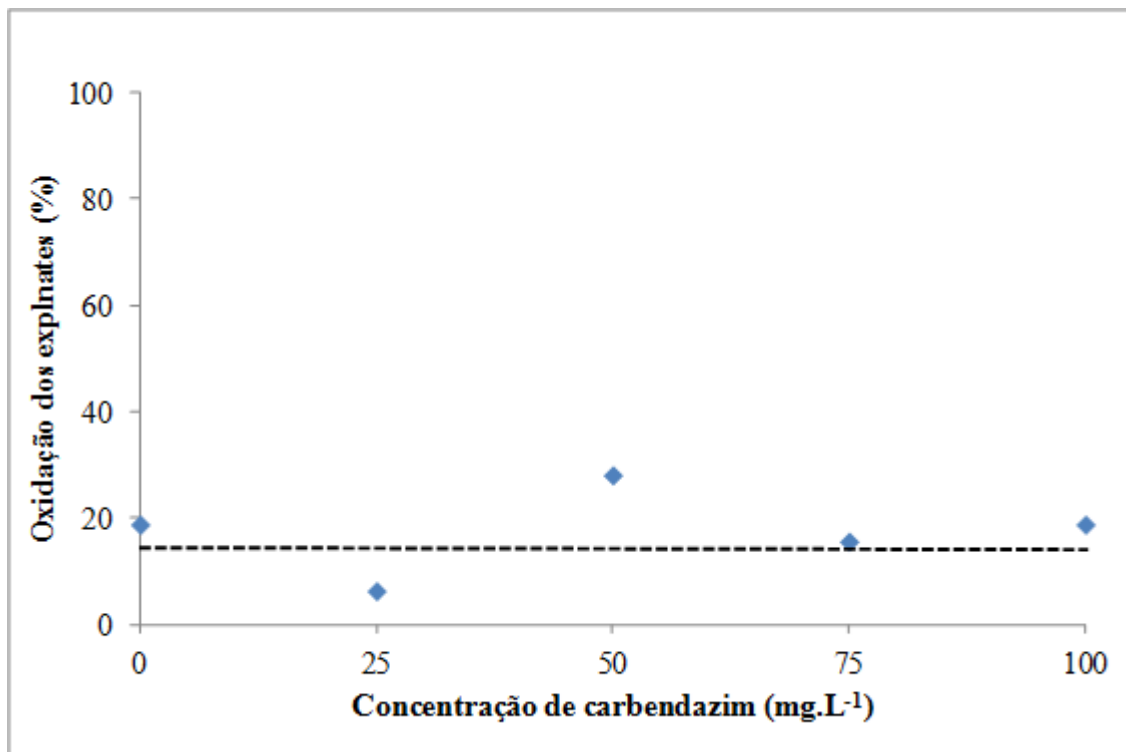


Figura 3. Porcentagem de oxidação dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

Com relação à sobrevivência dos explantes (Figura 4), verificou-se um aumento linear crescente da sobrevivência dos explantes, o qual foi proporcional ao aumento da concentração de carbendazim. O tratamento com 100 mg.L⁻¹ de carbendazim aumentou aproximadamente em 11% a porcentagem de sobrevivência dos explantes quando comparado ao controle (explantes não tratados com fungicida), e a média geral de sobrevivência dos explantes foi de 15% com um coeficiente de variação em 62,7%.

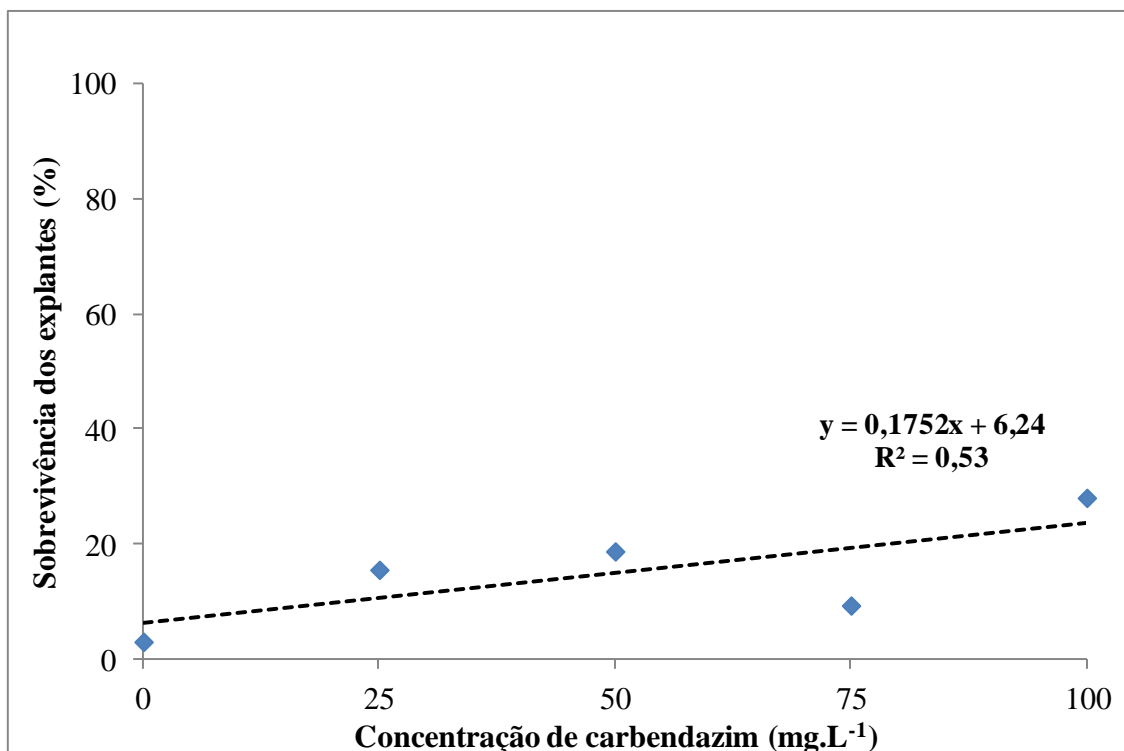


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência dos explantes em jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) aos 14 dias de estabelecimento *in vitro* em função do tratamento com diferentes concentrações de carbendazim. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

Apesar do uso do fungicida carbendazim aumentar a sobrevivência dos explantes, o elevado índice de contaminação fúngica e bacteriana, bem como a oxidação dos explantes, no decorrer do experimento causou a inibição completa do estabelecimento *in vitro* de jamelão. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) um dos maiores problemas no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na dificuldade de se obter explantes livres de contaminação (fungos e bactérias), bem como, pelo acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos, o que muitas vezes dificulta os processos iniciais da cultura de tecidos de diversas espécies de plantas, sendo desta forma, primordial o tratamento das matrizes doadoras de explantes com agentes fungicidas e bactericidas.

De acordo com Scherwinski-Pereira e Costa (2010) à presença de microrganismos, em geral, compete com os explantes, em espaço, carboidratos, nutrientes e outros compostos, podendo também liberar no meio substâncias tóxicas prejudiciais ao crescimento do material *in vitro*. O sucesso na micropropagação é totalmente dependente da utilização de plantas matrizes saudáveis, pois a maior fonte de contaminação primária na cultura de tecidos vegetais provém da planta-matriz, por isso sua condição fitossanitária é de extrema importância (MONTARROYOS, 2000).

6. CONCLUSÕES

Explantes de jamelão tratados com peróxido de hidrogênio por 10 minutos apresentaram maior sobrevivência do que àqueles tratados com hipoclorito de sódio pelo mesmo tempo.

O tratamento com carbendazim promove um aumento da sobrevivência dos explantes de jamelão diretamente proporcional ao aumento da concentração do fungicida.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos adicionais devem ser realizados no sentido de otimizar a desinfestação superficial e o controle oxidativo durante o estabelecimento *in vitro* de jamelão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.11, p.37-50, 2001.

ALCANTARA, G. B.; OLIVEIRA, Y.; LIMA, D. M.; FOGAÇA, L. A.; PINTO, F.; BIASI, L. A. Efeito dos ácidos naftaleno acético e indolilbutírico no enraizamento de estacas de jambolão [*Syzygium cumini* (L.) Skeels]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.12, n.3, p.317-321, 2010.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. EMBRAPA. Planaltina, p.182-186, 1998.

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

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Panorama. Editora Gazeta Santa Cruz Ltda, 2011.

ARAÚJO, M da C da R.; CASTRO, A.M de; CHAGAS, E.A.; SILVA, M.L da; FLORES, P. S.; SILVA, S da. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Bento Gonçalves, p.527-530, out.2012.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.16, n.4, p.381-390, 2006.

BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotrópica**. Campinas, V.11, n.1, 2011.

BLUMENTHAL, M. W. R.; BUSSE, A.; GOLDBERG, J.; GRUENWALD, T.; HALL, W.; RIGGINS, C. W.; RISTER, R. S. **The complete german commission e monographs: therapeutic guide to herbal medicines**. Austin: American Botanical Council, Integrative Medicine Communications. Boston, p. 79-154, 1998.

BONGAERTS, R. J. M. **The chorismate branching point in *Catharanthus roseus*. Aspects of anthranilate synthase regulation in relation to indole alkaloid biosynthesis.** Tese (Ph.D.) - University of Leiden, The Netherlands, 1998.

BORGES, B. P dos. S.; SILVA, T dos S.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F de. **Estabelecimento *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* Tul.** Departamento de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011. Disponível em: <<http://www2.uefs.br/semic/upload/2011/2011XV-032B%C3%A1828-220.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

CALDAS, L. S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jaboticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.1, p.107, jun.1993.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C de. Microrganismos assintomáticos do cultivo *in vitro*: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 446p.

CARNEIRO, M. de F.; SILVA, G. D da; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n.1, p.29-35, 2000.

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.

DANADIO, L. C.; NACHITIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas.** Funep, Jaboticabal, p.119-120, 1998.

DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides*.** Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas - Araraquara, p.1-10, 2000.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.759-764, 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de Macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.221-227, 2003.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-42, 2004.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; GEERT-JAN, K. **Plant propagation by tissue culture**. 3^aed, v.1, The Background, 2008.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees and overview. **Tree**, v.18, n.2, p.115-135, 2004.

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/CBAB, p.183-260, 1998.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.81-100, 2002.

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

HONDA, H.; LIU, C.; KOBAYASHI, T. Large-scale plant micropropagation. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.72, p.157-182, 2001.

JULIATTI, F. C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos**. Departamento de Fitopatologia, ICIAG/Universidade Federal de Uberlândia. 2002.

LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R da. Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): Processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.847-852, 2006.

LATTUADA, D. S. **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. Dissertação (Mestrado em fitotecnia)– UFRGS- Porto Alegre, 2010.

LEIFERT, C.; WAITES, W. M. Dealing with microbial contaminants in plant tissue culture; hazard analysis and critical control points. In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Ed). **Physiology, growth and development of plants in culture**, Dordrecht: Kluwer Academic. p.363-378,1994.

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

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.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C de.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 1ª ed, v.1, p.352, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 2ªed, v.2, p.266, 2000.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M de.; TORRES. M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas do Brasil, madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, v.1, p.297, 2003

MACHADO, A. A.; SILVA, J. G. C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A. R. **Winstat-sistema de análise estatística para Windows**, 1999.

- MANICA, I. Técnicas de produção e mercado: feijão, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba. **Frutas nativas silvestres e exóticas**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.541, 2002.
- MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.6, p.1668-1671, 2007.
- MATTOS, I. L. de; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova** [online]. 2003, vol.26, n.3, p.373-380.
- MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.6, p.1061-1065, 2003.
- MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Araraquara, v.25, n.2, p.310-314, 2006.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p.5-10, 2000.
- MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; FILHO, J. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.2, p.39-44, 2007.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- NIETSCHKE, S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.989-991, 2006.
- OLIVEIRA, G. F de; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA FILHO, A. A. da.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, Franca, v.38, p.381-384, 2007.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA-FAEPE, p-74, 2001.

SA, A. P. C. S. **Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygium cumini*, L. Skeels)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UFRRJ - Seropédica, 2008.

SANTOS, D. C. dos; WENDLING, I. Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate. **ISSN**. v.4, n.2, 2010.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A de; SOUZA, V. C de. Micropropagação de *Celtis sp*: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, 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.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. da S. Estratégias de seleção e uso de substâncias químicas antimicrobianas para o controle de contaminantes na cultura de tecidos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 446p.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, C. R.; EMRICH, B. E; MARTONOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.1048-1053, 2007.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. **In: Encontro Latino Americano de Biotecnologia**, 4., Goiânia, 2001.

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.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. **Jambolão: o poderoso antioxidante**. Embrapa Clima Temperado. Artigo de Divulgação na Mídia. Publicado em 2009. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/jambolao_Marcia.pdf. Acesso em: 03 de abril de 2013.

WALIA, N.; SINHA, S.; BABBAR, S. B. Micropropagation of *Crataeva nurvala*.
Biologia Plantarum, v.46, n.2, p.181-185, 2003.

ANEXOS



Figura 5: Explantes caulinares de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels), tratados com diferentes concentrações de carbendazim , aos 14dias de estabelecimento *in vitro*.



Figura 6: Explantes caulinares de jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels), tratados com peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio em diferentes tempos de desinfestação, aos 14 dias de estabelecimento *in vitro*.