

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PROREITORIA DE GRADUAÇÃO  
ESCOLA POLITÉCNICA E DE ARTES  
CURSO DE AGRONOMIA**

**USO DE HIPOCLORITO NA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES E EFEITO  
DE FITOHORMÔNIOS SOBRE A PROPAGAÇÃO IN VITRO DE BAUNILHA  
(*Vanilla bahiana* Hoehne).**

Joyce Gomes de Almeida

GOIÂNIA-GO

2023

JOYCE GOMES DE ALMEIDA

**USO DE HIPOCLORITO NA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES E  
EFEITO DE FITOHORMÔNIOS SOBRE A PROPAGAÇÃO IN VITRO DE  
BAUNILHA (*Vanilla bahiana* Hoehne).**

Artigo apresentado como requisito parcial para  
composição de média final na disciplina de  
Trabalho de Conclusão de Curso, do curso de  
graduação em Agronomia, da Pontifícia  
Universidade Católica de Goiás, PUC-Goiás.

Orientador: Prof. Dr. Jales Teixeira Chaves Filho

GOIÂNIA-GO

2023

JOYCE GOMES DE ALMEIDA

**USO DE HIPOCLORITO NA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES E EFEITO  
DE FITOHORMÔNIOS SOBRE A PROPAGAÇÃO IN VITRO DE BAUNILHA  
(*Vanilla bahiana* Hoehne).**

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Jales Teixeira Chaves Filho  
(Doutor em Ciências Biológicas)  
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martha Nascimento Castro  
(Doutora em Agronomia)  
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

---

Dr<sup>a</sup> Maurízia de Fátima Carneiro  
(Doutora em Agronomia)  
Emater GO

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

## DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à Deus e a Nossa Senhora.

Aos meus pais, Jairo e Regiane.

Aos meus irmãos, Jaime e Jaqueline e a cada um dos meus sobrinhos.

Dedico a cada uma das minhas avós que eu gostaria com toda a força que estivessem aqui.

“Porque até aqui nos ajudou o Senhor. (I Samuel 7,12) ”.

## **AGRADECIMENTOS**

Começo agradecendo à Jesus e a Nossa Senhora, por absolutamente tudo, não há força maior que a que vem do céu.

À minha família, de forma especial e de todo meu coração, aos meus pais Jairo Almeida e Regiane Gomes, vocês me impulsionam como força motriz, são o princípio e a razão de tudo. Agradeço aos meus irmãos, Jaime Almeida e Jaqueline Almeida, vocês me encorajaram em todos os momentos e aos meus sobrinhos, que trouxeram leveza aos meus dias.

Agradeço ao professor Jales Teixeira pela orientação e condução neste trabalho e por toda a disponibilidade durante a minha graduação. A todo o corpo docente da Universidade e a coordenação de curso na pessoa da professora Martha Nascimento, que é uma profissional ímpar e uma inspiração.

À Emater e a toda equipe de laboratório, em especial à Doutora Maurízia Carneiro, por toda a orientação com os experimentos e por ter me proporcionado um novo olhar sobre a pesquisa. Ao Acrísio por toda ajuda nesse período e ao meu amigo Júnior, por ter sido um companheiro incansável e ter tornado os meus dias de laboratório melhores.

Estendo meus agradecimentos aos meus tios, tias e primos, que foram fonte inesgotável de alegria e apoio.

E por fim, a cada um dos meus amigos, que torceram e vibraram com cada uma das minhas conquistas. Aos de vida, de fé, de trabalho e principalmente e especialmente aos da graduação. Vocês dividiram comigo as dores, alegrias e iluminaram toda a minha vida.

Obrigada!

*“Minha tristeza não tem pedigree, já a minha vontade de alegria, sua raiz vai ao meu mil avô. Vai ser coxo na vida, é maldição pra homem. Mulher é desdobrável. Eu sou.” (Adélia Prado)*

## RESUMO

O fruto da baunilha é uma cápsula que é utilizada como um importante flavorizante e odorizante, mundialmente conhecida, especialmente em forma de essência, cuja representante brasileira é a espécie *Vanilla bahiana*, espécie nativa com ocorrência em diversas regiões, como Nordeste e Centro-Oeste. A micropropagação visa garantir a multiplicação dessa espécie, possibilitando os estudos acerca de sua utilidade como substituta das baunilhas importadas e a possibilidade de utilização na gastronomia e cosmética. Entre as diversas fases da micropropagação existe a descontaminação dos explantes de plantas originárias do campo para garantir a multiplicação e a produção de mudas saudáveis, sendo um desafio encontrar o método ideal, bem como a concentração correta de diferentes fitohormônios usados na micropropagação. Dessa forma pretendeu-se, neste trabalho, avaliar o uso de diferentes dosagens de hipoclorito de sódio para a descontaminação dos explantes estabelecidos *in vitro* e a resposta a diferentes combinações dos hormônios vegetais BAP, ANA e GA<sub>3</sub>. Em nenhum dos tratamentos de descontaminação houve resultado satisfatório, ocorrendo contaminação de todos os explantes. Já a utilização de fitohormônios não apresentou diferença estatística em número de raízes e folhas, porém foi observado maior número de brotações em concentrações: 2 mg/l de BAP; 2 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de GA<sub>3</sub>; 2,0 mg/l de BAP e 0,25 mg/l de ANA; 2 mg/l de BAP, 0,5 mg/l de GA<sub>3</sub> e 0,25 mg/l de ANA; que correspondem a T1, T3, T4 e T6, respectivamente. Também houve diferença significativa em altura de plantas na concentração de 2,0 mg/l de BAP, que corresponde a T1.

**Palavras-chave:** Baunilha, *Vanilla baiana* Hoehne, Micropropagação, Hipoclorito de Sódio, Fitohormônios.

## ABSTRACT

The vanilla fruit is a capsule that is used as an important flavoring and odorant, known worldwide, especially in the form of an essence, where the Brazilian representative is the *Vanilla Bahiana* species, a native species that occurs in many regions, such as the Brazilian Northeast and Midwest. Micropropagation aims to ensure the multiplication of this species, enabling studies on its usefulness as a substitute for imported vanilla and the possibility of use in gastronomy and cosmetics. Among the various stages of micropropagation, there is the decontamination of plant explants originating from field to ensure multiplication and the production of healthy seedlings, being a challenge to find the ideal method, as well as the correct concentration of different phytohormones used in micropropagation. Thus, the aim of this work was to evaluate the use of different dosages of sodium hypochlorite for the decontamination of explants established in vitro and the response to different combinations of plant hormones BAP, ANA and GA<sub>3</sub>. Neither of the decontamination treatments had a satisfactory result, with contamination of all explants. On the Other hand, the use of phytohormones did not present statistical difference in the number of roots and leaves, but a greater number of shoots was observed in concentrations: 2 mg/l of BAP; 2 mg/l of BAP and 0.5 mg/l of GA<sub>3</sub>; 2.0 mg/l BAP and 0.25 mg/l ANA; 2 mg/l of BAP, 0.5 mg/l of GA<sub>3</sub> and 0.25 mg/l of ANA; which correspond to T1, T3, T4 and T6, respectively. There was also a significant difference in plant height at the concentration of 2.0 mg/l of BAP, which corresponds to T1.

**Keywords:** Vanilla, *Vanilla bahiana* Hoehen, Micropropagation, Sodium Hypochlorite, Phytohormones.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1. Descontaminação de explantes de baunilha ( <i>Vanilla bahiana</i> ) em diferentes concentrações de hipoclorito.....	16
4.2. Multiplicação de segmentos nodais sob a ação de diferentes fitorreguladores.....	17
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A baunilha é uma especiaria altamente consumida no mundo, especialmente como essência, seja sendo utilizada como flavorizante na gastronomia ou na produção cosmética graças ao seu alto potencial odorizante. Apresenta um elevado custo e seu produto processado, por vezes mais caro que ouro.

O alto valor atribuído à baunilha se dá ao limitadíssimo processo de cultivo e a baixa produção. É cultivada em escala comercial em regiões do México, Indonésia, Madagascar e Guatemala. A essência é extraída a partir da vagem onde se encontram as sementes da baunilha.

A *Vanilla bahiana* é uma espécie típica do Brasil, encontrada em diversas regiões, incluindo o Centro-Oeste e estudos preliminares indicam a possibilidade de sua utilização como substituta às baunilhas importadas, e apesar de típica das regiões brasileiras, é uma espécie pouco usada e explorada no país.

Entre as diversas possibilidades de produção de mudas de baunilha está a propagação *in vitro*, bastante utilizada para outras espécies de orquídeas. O cultivo *in vitro* visa garantir a reprodução, sanidade das mudas e ainda possibilita o desenvolvimento de pesquisas voltadas a descobrir o real potencial da espécie. Para que se manifeste as características que possibilitam a repicagem, são utilizadas substâncias sintéticas, que são fitohormônios e podem induzir formação de calos, enraizamento e brotação para então a partir dessas formações trabalharem sua multiplicação.

Para além das formações, no laboratório o material vegetal pode ser proveniente do campo ou de amostras cultivadas em ambiente controlado e por esse motivo os protocolos de descontaminação são um dos fatores de maior influência no resultado da micropropagação. Podem ser utilizados protocolos de lavagem com água e sabão, álcool 70%, hipocloritos de sódio e/ou de cloro.

A descontaminação tem função de impedir que patógenos, como fungos e bactérias se manifestem e provoquem a morte do segmento nodal implantado. Os patógenos podem ser endógenos ou exógenos e apenas a lavagem com água e sabão não são suficientes para garantir a não manifestação e ação dos microrganismos.

## 2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração ideal de hipoclorito de sódio para desinfecção de explantes de baunilha (*Vanilla bahiana*) para sua propagação *in vitro* sob, bem como verificar o efeito de diferentes combinações de fitohormônios sobre o crescimento inicial dos explantes.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Vanilina é um aldeído, composto químico extraído de espécies de orquídea. Conhecido popularmente como baunilha, sua essência é muito usada na produção alimentícia, perfumaria, produção de cosméticos e sabonetes, pela alta capacidade aromática (DAUGSCH, 2005).

A forma mais comumente encontrada e utilizada no Brasil é a essência de Baunilha um produto importado, entretanto, há pequenos cultivos que atendem de forma tímida o mercado interno (BRUMANO, 2019).

A baunilha é uma orquídea trepadeira, da família Orchidaceae, com origem relatada no México, Guatemala e outras regiões da América Central. Os maiores produtores mundiais são Madagascar, Indonésia, Guatemala e México. A Baunilha originária de Madagascar é a que apresenta melhor qualidade e ficou conhecida como “Bourbon” (HOMMA *et al.*, 2006).

Caracterizada pelo hábito de crescimento hemiepífita, as orquídeas germinam em árvores e procuram suporte para o desenvolvimento. Apresentam 4 cm ou mais de espaçamento de entrenós, as folhas são sesseis, em algumas orquídeas, como a Bourbon, as flores apresentam sépalas e pétalas esverdeadas (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

O destaque se dá pelo aroma e sabor, tem seu uso conhecido desde os povos antigos, nativos da América Central como maias e astecas. A baunilheira apresenta crescimento monopodial, comumente a sombra de árvores e para que se tenham uma produção satisfatória é necessária polinização manual já que o índice de polinização natural é de menos de 1% (NUNES, 2013).

A possibilidade de se produzir mudas sadias, com as características da planta matriz, tem sido possibilitada pelo uso de cultura de tecido. A baunilheira é comumente reproduzida por estaquia, entretanto a utilização da micropropagação tende a garantir multiplicação de forma rápida, por ser cultivada em ambiente controlado com baixa troca gasosa, o que assegura a qualidade dos clones e utiliza-se pequeno espaço físico (NUNES, 2013)

A cultura de tecido se define como o cultivo de partes vivas, explantes, de uma planta e estes podem ser células, órgãos ou frações de tecidos, de forma asséptica, em ambiente controlado de modo a se gerar uma nova planta, de acordo Lameira *et*

*al.* (2000). Para o autor as principais vantagens da micropropagação e cultura de tecido, está na redução do tempo para multiplicação, efetivo controle de sanidade na propagação, alto volume de propagação em pequeno espaço e a baixo custo. Já as desvantagens se dão devido ao alto custo de implantação inicial, especialmente com estrutura (laboratório e equipamentos), reagentes, vidrarias e, também profissionais capacitados para a operação.

A multiplicação é feita a partir de protocolos previamente definidos, tendo como meio mais comum e utilizado o meio MS, desenvolvido por Murashige e Skoog (1962). O meio é composto de nutrientes capazes de fornecer ao explante a nutrição necessária para seu desenvolvimento *in vitro*.

A partir da base estabelecida por Murashige e Skoog, podem ser realizadas adições de outros nutrientes, como também fitorreguladores para desenvolvimento desejado, como ocorre com indutores de enraizamento e brotação (CARVALHO *et al.*, 2003).

De acordo com Nunes (2013), a micropropagação, tem por pressuposto a presença de carboidrato no meio de cultivo, o que induz a produção de biomassa. São mantidos em condições de ambiente e umidade controlados, o açúcar é responsável pelo fornecimento de carbono e energia e o desenvolvimento nessas condições os tornam indivíduos heterotróficos, devido às mudanças anatômicas e metabólicas que sofrem.

Para que se desenvolva em laboratório, em algumas espécies é realizada a adição de substâncias sintéticas ao meio que será utilizado para o estabelecimento dos explantes, visando induzir características específicas no desenvolvimento dos mesmos, essas substâncias são os hormônios vegetais e são muito utilizados na micropropagação (PETRI *et al.*, 2016).

Os fitorreguladores ou fitohormônios, são substâncias que na cultura de tecido, são acrescidas ao meio para que ocorra o desenvolvimento de partes da planta (MORAIS *et al.*, 2014). Cada fitohormônio tem uma função durante o desenvolvimento do explante na cultura *in vitro* e as dosagens seguem protocolos, mas variam de acordo com a cultura e o interesse, especialmente para o desenvolvimento de pesquisas.

Essas substâncias são reguladoras sintéticas e propiciam o desenvolvimento de determinadas respostas, seja multiplicação, alongamento ou crescimento

(PINHAL, 2011). Ou seja, podem induzir desde brotamento a emissão de raízes, a partir do princípio de ação de cada regulador.

A utilização de fitohormônios no meio tem o objetivo de cessar possíveis deficiências dos teores endógenos. As citocininas atuam na diferenciação e regeneração, induz divisão celular e proliferação, tendo como um dos representantes o 6-benzilaminopurina (BAP) (NASCIMENTO, 2007).

Outro fitohormônio importante são as auxinas, e podem ser representadas por AIA (Ácido 3-indolaético), AIB (Ácido indolbutírico), ANA (Ácido naftalenoacético), usados para enraizamento e indutor de crescimento de raízes adventícias (MELO, 2002).

Já no grupo das giberelinas, tem-se o GA<sub>3</sub>, são cadeias de 19 ou 20 carbonos, tendo a possibilidades de várias alterações na estrutura e cada uma delas recebe uma numeração, de acordo com Biasi (2002), existem cerca de 118 combinações e por isso são numeradas de AG<sub>1</sub> a AG<sub>118</sub>.

As giberelinas são sintetizadas nos tecidos jovens e em sementes, transportadas pelos vasos condutores xilema e floema e são responsáveis por crescimento de caule, indução de germinação e crescimento de frutos (MELO, 2002).

A união de mais de um fitorregulador e sua utilização em um meio de cultura, aumenta as possibilidades de desenvolvimento dos explantes estabelecidos em laboratório. O objetivo da utilização é que ocorra a multiplicação celular e se desenvolvam estruturas capazes de promover o desenvolvimento das plantas, especialmente ao ser alocada em campo (MELO, 2002). Com estruturas como raiz, caules e primeiras folhas prósperas, o transplante para o local definitivo se torna mais eficaz e promove a redução de perdas.

Um dos maiores desafios para a cultura *in vitro* é a dificuldade em conseguir tecido livre de contaminação, sejam bactérias ou fungos (SANTOS *et al.*, 2015). A sanidade do tecido no laboratório, garante a qualidade das mudas produzidas. Ainda de acordo com o autor, é muito comum a contaminação das plantas advindas do campo, mas ainda as que vivem sob controle fitossanitários e/ou ambientes controlados como casas de propagação e viveiros de muda, podem apresentar algum nível de contaminante e pode ser limitante para o cultivo *in vitro*.

É muito comum que a planta matriz esteja alocada em campo e o explantes provenientes dessa planta estejam contaminados por patógenos, como fungos e

bactérias, de modo que protocolos de desinfecção sejam necessários. Há uma linha tênue entre a dosagem eficaz para desinfecção e a queima do tecido vegetal. (PEREIRA *et al.*, 2015).

Os contaminantes são prejudiciais pois os patógenos tendem a retirar do meio de cultura os nutrientes e gerar competição com os tecidos implantados (ARAÚJO, 2007). Dessa forma além da possibilidade de retardar o desenvolvimento do explante, o empobrecimento do meio pode causar a morte do tecido pela inibição de seu desenvolvimento.

O que ocorre em muitos casos é que a alta dosagem, especialmente dos hipocloritos, pode causar a queima, necrose e levar a morte do tecido do explante, impedindo assim sua reprodução. Outro fator a ser considerado é que as baixas dosagens podem não ser eficazes na descontaminação e os patógenos se manifestarem após a implantação do explante no meio de cultura (PEREIRA *et al.*, 2015).

Há em algumas culturas protocolos já estabelecidos, com dosagens de hipoclorito conhecidas e suficientes para a descontaminação total. Já em outros cultivos são necessários mais de um processo de desinfecção, unindo mais de um método para que o resultado seja satisfatório. Apenas após o processo de desinfecção é que o explante encontra-se em condições de ser estabelecido no meio (DINIZ *et al.*, 2015).

Há também no mercado alternativas como o PPM<sup>®</sup>, um biocida sintético de amplo espectro, que penetra a parede celular e inibe a atividade enzimática do metabolismo de fungos e bactérias e neutraliza o crescimento. É estável ao calor e pode ser autoclavado juntamente com o meio de cultura (PACHECO; RODRIGUES, 2021).

Desta forma, o estudo sobre a propagação *in vitro* de baunilha no que se refere à desinfecção de material para produção de explantes e o efeito de fitohormônios sobre o estabelecimento e crescimento inicial são importantes e demonstram relevância devido ao interesse da espécie e, também pela sua possibilidade de conservação *ex situ*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de cultura de tecido da Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária (EMATER), localizado na Rodovia R-2, Quadra Área, Lote AR-3 Campus Samambaia, Goiânia-GO.

### 4.1. Descontaminação de explantes de baunilha (*Vanilla bahiana*) em diferentes concentrações de hipoclorito.

Para o primeiro experimento de desinfecção foi preparado dia 10/04/2023 o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 20 g/l de sacarose, 0,1 g/l de Inositol e 6,7 g/l de Ágar, com o pH ajustado com o auxílio de NaOH 1,0 e HCl 0,2 em 5,8, de acordo com o protocolo do Laboratório de Cultura de Tecido da EMATER GO, para o estabelecimento dos explantes de baunilha.

Dia 14/04/2023 foram coletados segmentos nodais de uma planta matriz de *Vanilla bahiana* da coleção biológica da Emater, mantida no campo, estabelecida no local há 22 anos, tendo sido coletado gemas laterais das brotações mais jovens. Os fragmentos foram coletados com tamanho variando de 3 a 4 cm, utilizando bisturi sempre observando a presença de folha no segmento nodal escolhido. Para cada corte foi realizado a descontaminação do bisturi com hipoclorito de sódio 0,50% e foram colocados no saquinho plástico identificado de acordo com o tratamento a ser realizado.

O material coletado foi levado ao laboratório onde foram trabalhados separadamente os tratamentos, lavados com o auxílio de escova de cerdas macias, detergente e água corrente. Todos foram submetidos a um processo primário e geral de desinfecção, utilizando-se 250 ml de hipoclorito de sódio à 0,10%, por 5 minutos, sempre respeitando a divisão por tratamentos inicial. O hipoclorito a 0,10% foi utilizado como testemunha em substituição ao álcool 70%, que é utilizado nos protocolos de descontaminação para que fosse observado o comportamento do explante e dos contaminantes.

Após a etapa de limpeza, os segmentos foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1- Testemunha; T2- Hipoclorito 0,25%; T3- Hipoclorito 0,50%; T4-

Hipoclorito 0,75%; T5- Hipoclorito 1,0%; T6- Hipoclorito 1,5%; T7- Hipoclorito 2,0%; T8- PPM.

Em T1, foi utilizado somente o protocolo inicial de lavagem e descontaminação com hipoclorito a 0,10% utilizado para todos os tratamentos.

Em T2, T3, T4, T5, T6 e T7, após o protocolo inicial de limpeza, os segmentos nodais foram colocados em béqueres com um litro de hipoclorito nas dosagens: 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, respectivamente e mantidos sob agitação com o auxílio de um bastão por 10 minutos.

Para o tratamento T8, os segmentos foram submetidos a higienização inicial, após esse processo foram estabelecidos no meio MS acrescido de Plant Preservative Mixture (PPM®), um biocida de amplo espectro que inibe a atividade enzimática de fungos e bactérias e neutraliza o crescimento, agindo através da penetração da parede celular. Foi adicionado durante o preparo do meio, e como é estável ao calor não sofre alterações quando submetido a altas temperaturas.

Após os procedimentos de desinfecção, as amostras foram levadas para câmara de fluxo, lavadas três vezes com água que foi previamente destilada e autoclavada, após a lavagem os segmentos foram reduzidos ao tamanho de 2 cm e estabelecidos em tubos de ensaio que continham 10 ml de meio MS, com pH ajustado para 5,8. Após o estabelecimento foram mantidos em câmara de crescimento com lâmpadas artificiais de LED do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas, temperatura em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e sem umidade.

#### **4.2. Multiplicação de segmentos nodais sob a ação de diferentes fitorreguladores**

Em um segundo experimento, os tratamentos foram dispostos da seguinte forma: T1- apenas BAP na concentração de 2,0 mg/l; T2- apenas GA3 na concentração de 0,5 mg/l; T3- BAP+GA3 na concentração de 2,0 mg/l e 0,5mg/l, respectivamente; T4- BAP+ANA na concentração de 2,0 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T5- GA3+ANA na concentração de 0,5mg/l e 0,25mg/l, respectivamente e T6- BAP+GA3+ANA na concentração de 2,0 mg/l, 0,50 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente.

Para o experimento foram retirados segmentos nodais de *Vanilla bahiana* Hoehne cultivadas no laboratório de cultura de tecidos da Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária (EMATER), localizado na Rodovia R-2, Quadra Área, Lote AR-3 Campus Samambaia, Goiânia-GO.

Os explantes foram estabelecidos em frascos de vidro, contendo 40 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 20 g/l de sacarose, 0,1 g/l de Inositol e 6,7 g/l de Ágar, com o pH ajustado em 5,8, de acordo com o protocolo do Laboratório de Cultura de Tecido da EMATER GO, para o estabelecimento dos explantes de baunilha. Foram usados 4 frascos, onde continham 5 segmentos nodais cada, como repetição. Os explantes foram escolhidos ao acaso e reduzidos a tamanhos entre 1 e 1,5 cm e estabelecidos em câmara de fluxo. Após o estabelecimento foram mantidos em câmara de crescimento com lâmpadas artificiais de LED do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas, temperatura em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro experimento foi analisado a cada 5 dias, foram contabilizados os explantes contaminados em cada tratamento e dispostos no quadro a seguir:

Os resultados observados no presente trabalho indicaram que após cinco dias do início da aplicação dos tratamentos (Quadro 1), o percentual de contaminação do meio onde estavam os explantes variou de 50% (tratamento T8) a 100% (tratamento T1). Ao longo das avaliações que foram realizadas a cada cinco dias, observou-se que os meios não contaminados foram progressivamente apresentando contaminantes até que aos 20 dias todas as repetições em todos os tratamentos apresentaram contaminações.

Quadro 1- Número de explantes contaminados em meio de cultura de baunilha (*Vanilla bahiana* Hoehne) sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfecção em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 20 dias do início das observações.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE EXPLANTES CONTAMINADOS			
	05 dias	10 dias	15 dias	20 dias
T1 – TESTEMUNHA	20	20	20	20
T2 - HIPOCLORITO 0,25%	19	20	20	20
T3 - HIPOCLORITO 0,50%	19	20	20	20
T4 - HIPOCLORITO 0,75%	20	20	20	20
T5 - HIPOCLORITO 1,0%	18	19	20	20
T6 - HIPOCLORITO 1,5%	17	20	20	20
T7 - HIPOCLORITO 2,0%	15	18	18	20
T8 – PPM	10	11	16	20

Fonte: Almeida (2023).

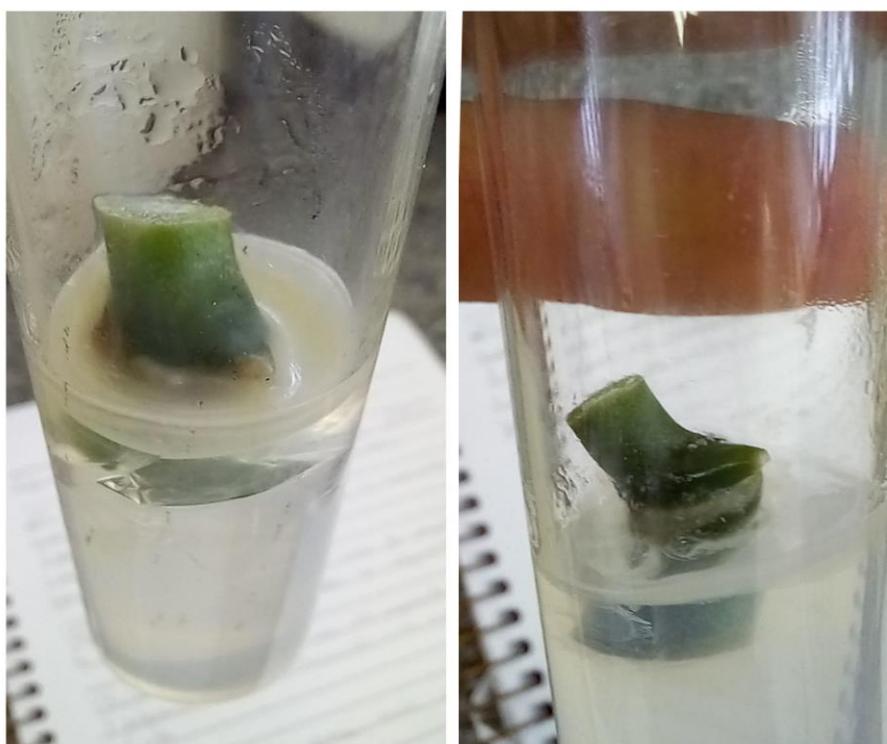
Na figura 1 pode ser observada a contaminação dos meios no tratamento testemunha aos 20 dias do início dos tratamentos, sendo que o tratamento T7 que utilizou-se da maior concentração de hipoclorito de sódio (2%) (Figura 2) também foi evidenciada a presença de contaminantes.

Figura 1- Presença de contaminação em meio de cultura contendo explantes de baunilha (*Vanilla bahiana* Hoehne) sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfecção (T1- Testemunha) em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 20 dias do início das observações.



Fonte: Almeida (2023).

Figura 2- Presença de contaminação em meio de cultura contendo explantes de baunilha (*Vanilla bahiana* Hoehne) sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfecção (T7- Hipoclorito 2,0%) em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 20 dias do início das observações.



Fonte: Almeida (2023).

Foi também constatado que no tratamento T8 no qual se adicionou o produto PPM, um biocida sintético de amplo espectro, houve igualmente contaminação dos meios, não sendo capaz de impedir de forma efetiva a infecção dos explantes (Figura 3).

Figura 3- Presença de contaminação em meio de cultura contendo explantes de baunilha (*Vanilla bahiana* Hoehne) sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfecção (T8- PPM) em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 20 dias do início das observações.



Fonte: Almeida (2023).

Nos meios foram observados o desenvolvimento de fungos com a presença de micélio típico deste grupo de organismos e bactérias com o desenvolvimento de colônias. Não foi realizado neste trabalho a identificação dos contaminantes, uma vez que não foi objeto desta pesquisa e devido ao tempo para realização e desenvolvimento do artigo, sendo necessários estudos posteriores para a correta identificação dos microrganismos.

Além da observação, as contaminações foram classificadas de acordo com a intensidade observada aos 20 dias do experimento (Quadro 2), em que todos os tubos apresentavam contaminação. A escala de avaliação de intensidade variava de 0 a 3, onde 0 representava ausência de infecção, 1 infecção leve, 2 infecções média e 3 infecções severa, conforme apresentado no quadro abaixo:

Quadro 2- Intensidade de contaminação em meio de cultura contendo explantes de baunilha (*Vanilla bahiana* Hoehne) sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfecção em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 20 dias do início das observações.

<b>CLASSIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DE CONTAMINAÇÃO AOS 20 DIAS</b>				
<b>TRATAMENTOS</b>	<b>INTENSIDADE</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
T1 – TESTEMUNHA	0	1	1	18
T2 - HIPOCLORITO 0,25%	0	0	0	20
T3 - HIPOCLORITO 0,50%	0	1	1	19
T4 - HIPOCLORITO 0,75%	0	0	1	19
T5 - HIPOCLORITO 1,0%	0	2	6	12
T6 - HIPOCLORITO 1,5%	0	2	5	13
T7 - HIPOCLORITO 2,0%	0	4	6	10
T8 – PPM®	0	6	4	10

Fonte: Almeida (2023).

As características levadas em consideração para a análise de intensidade da contaminação foram: coloração do tecido do explante, presença de raiz e/ou brotações. Em experimento com Lírios-da-paz, do gênero *Spathiphyllum*, Diniz (2008), obteve 70% de explantes livres de contaminação com o uso de apenas hipoclorito de sódio, o que não foi verificado neste trabalho, muito embora se trate de espécies e grupos distintos.

Uma possibilidade que pode ter ocorrido é a presença de microrganismos endofíticos na baunilha e mesmo com os tratamentos de desinfecção aplicados, houve o desenvolvimento de fungos e bactérias nos meios em todos os tratamentos. Segundo Azevedo (1998) os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior das plantas, podendo habitar, folhas, caules, raízes, não causando aparentemente nenhum dano, diferindo dos microrganismos fitopatogênicos.

Almeida *et al.* (2005) encontraram fungos endofíticos em ápices caulinares da pupunheira, onde verificaram que houve o desenvolvimento nos meios de cultura de materiais isolados de cultivos *in vivo* e *in vitro*, sendo que relataram que dentre os diversos fungos isolados, nenhum estava aparentemente causando sintomas de doenças nas plantas.

Kuss *et al.* (2007) conseguiram isolar bactérias diazotróficas endofíticas, que são bactérias que estão presentes e colonizam interiormente tecidos vegetais sem causar danos, em raízes de arroz e que além da fixação de nitrogênio atmosférico, tais bactérias foram capazes de produzir ácido Indolacético (AIA) uma auxina capaz de promover alterações no crescimento das plantas.

Segundo Esposito-Polesi (2011) em seu artigo de revisão afirma que a cultura de tecidos vegetais tem sido uma importante ferramenta com diversos fins, e que a obtenção de plantas assépticas tem sido o ideal nesta técnica de cultivo, eliminando qualquer contaminação nos meios de cultura, porém, existe em muitas plantas uma comunidade endofítica que exerce papel fundamental no estabelecimento e desenvolvimento das plantas, sendo inclusive benéficos no cultivo *in vitro*.

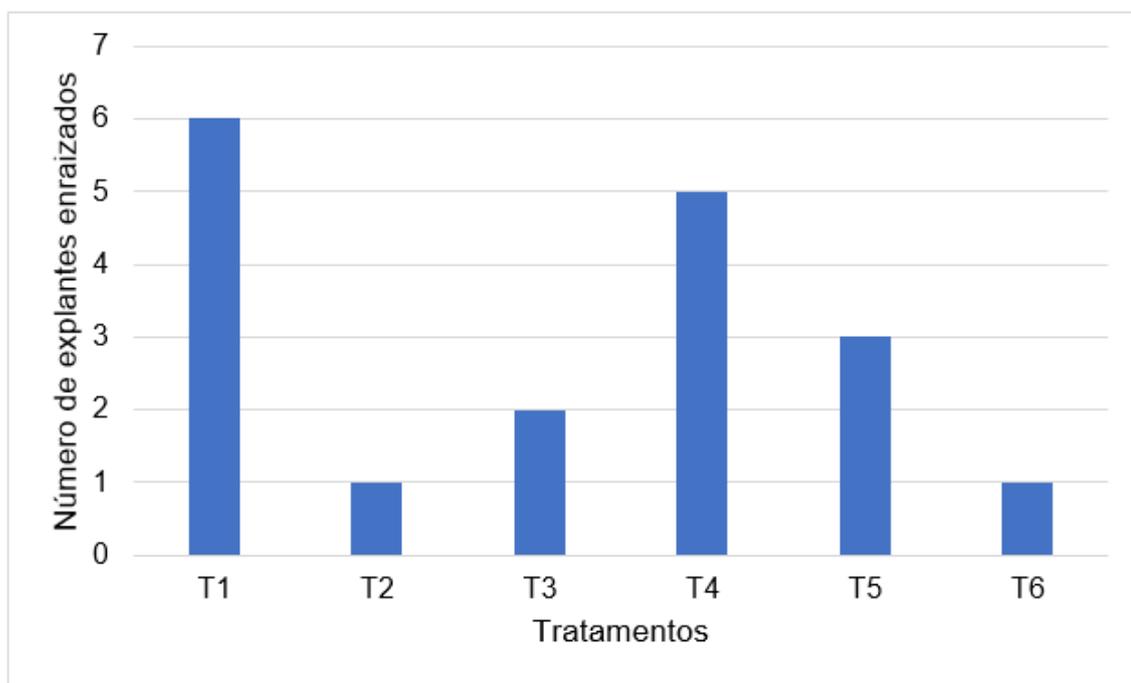
Percebe-se deste modo, que no caso da baunilha, especificamente na espécie *V. bahiana*, é necessário isolar e identificar os microrganismos observados, estudando melhor a relação com a planta, estabelecendo as melhores condições de isolamento e cultivo no caso da confirmação da presença de endofíticos.

Jiménez-Quesada *et al.* (2015) isolaram bactérias endofíticas em *Vanilla planifolia* pertencentes às famílias *Acetobacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Spirillaceae* e *Bacillaceae* e observando que uma das espécies isoladas tem potencial de proteção para a planta contra a invasão do fungo patógeno *Fusarium osysporum*.

Embora se trate de espécie diferente, os resultados verificados em *V. bahiana* apontam para a necessidade de outros estudos complementares e que podem trazer resultados inéditos para esta espécie em termos de relação planta-microrganismos.

Para a determinação do efeito de fitohormônios foram analisados número de raízes, brotações, folhas e altura de plantas. Os resultados obtidos para o número de explantes enraizados são mostrados na (Figura 4).

Figura 4-Número de explantes enraizados de baunilha (*Vanilla bahiana*) em meio de cultura sob diferentes concentrações de fitohormônios (T1-BAP 2,0 mg/l; T2-GA<sup>3</sup> 0,5 mg/l; T3-BAP+GA<sup>3</sup> 2,0 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente; T4-BAP+ANA 2,0 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T5-GA<sup>3</sup>+ANA 0,5 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T6-BAP+GA<sup>3</sup>+ANA 2,0 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l, respectivamente). Em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 30 dias do início das observações.



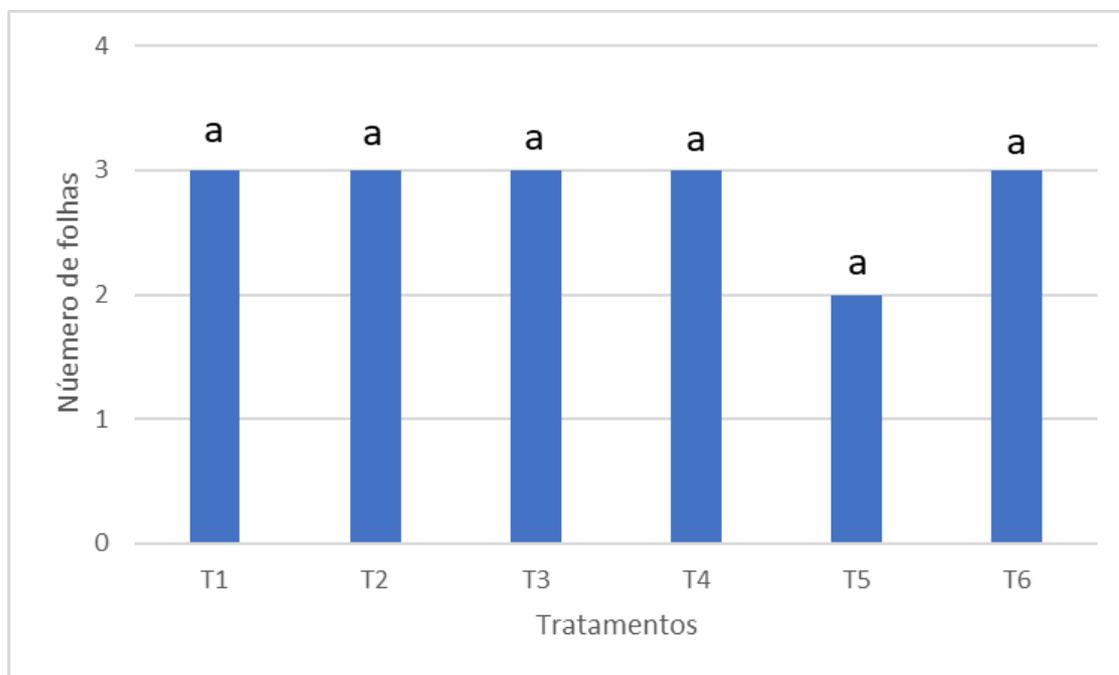
Fonte: Almeida (2023).

Pode ser observado que após 30 dias do início do experimento, o número de explantes enraizados sob a ação dos diferentes fitohormônios foi pequeno como maior número sendo apresentado pelo tratamento T1 com 6 explantes (30%) e os menores valores para os tratamentos T2 e T6 com apenas um explante (5%). Mesmo o tratamento T1 apresentando o maior valor, de forma geral foi um número que demonstra a dificuldade de estímulo ao enraizamento em *V. bahiana* com os fitohormônios em suas respectivas concentrações utilizadas neste trabalho.

Diniz *et al.* (2003) observou que o enraizamento da macela (*Egletes viscosa*) foi maior em concentrações crescentes de GA<sup>3</sup>, porém a figura 4 apresentou um menor número de raízes na presença do Ácido Giberélico. Devido ao baixo número de raízes apresentadas nos tratamentos, não foi necessário realizar a análise estatística, pois mesmo o maior valor foi baixo para ser considerado significativo para a metodologia *in vitro*.

Na figura 5 foram apresentados os resultados referentes o número de folhas observados nos explantes em diferentes concentrações de fitohormônios.

Figura 5-Número de folhas em explantes de baunilha (*Vanilla bahiana*) em meio de cultura sob diferentes concentrações de fitohormônios (T1-BAP 2,0 mg/l; T2-GA<sup>3</sup> 0,5 mg/l; T3-BAP+GA<sup>3</sup> 2,0 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente; T4-BAP+ANA 2,0 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T5-GA<sup>3</sup>+ANA 0,5 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T6-BAP+GA<sup>3</sup>+ANA 2,0 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l, respectivamente). Em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 30 dias do início das observações.



\*Tratamentos com mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Almeida (2023).

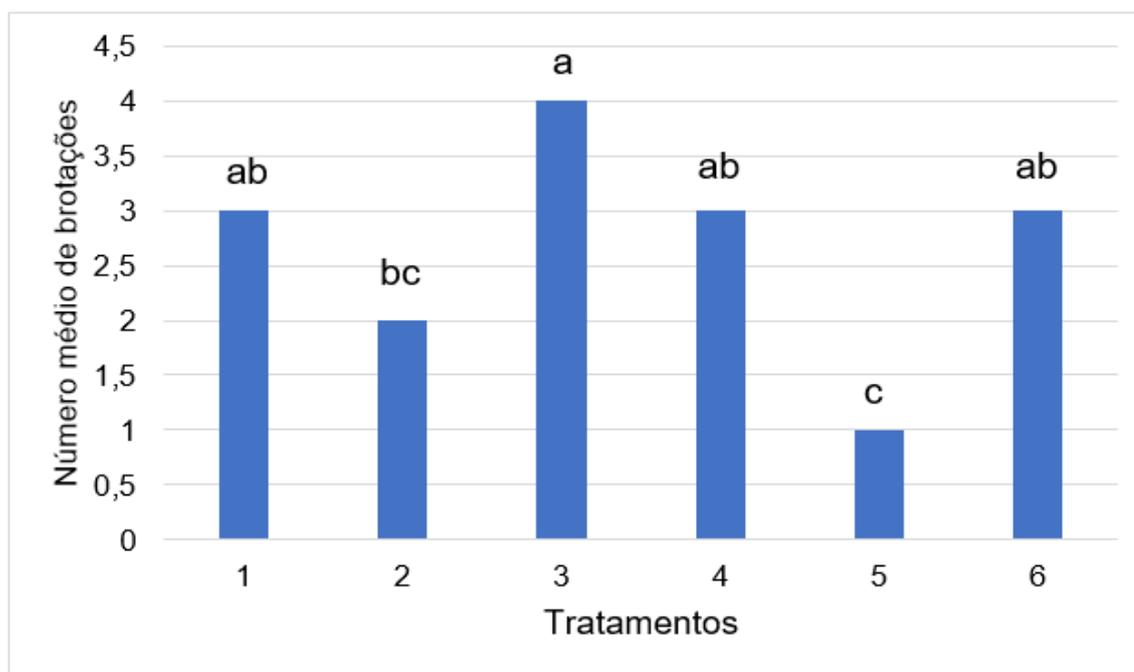
Para o número de folhas não houve diferença significativa, assim como apresentado por Lima *et al.* (2007), em que a união de BAP e ANA não apresentaram significância se tratando do número de folhas.

Graça *et al.* (2013) também não obteve significância em relação a suplementação do meio com BAP e GA<sub>3</sub> assim como no resultado obtido com esse experimento.

Segundo Zavalhia *et al.* (2018) os métodos *in vitro* tem sido muito utilizado na clonagem de plantas, pois, através da cultura de pedaços pequenos de tecido da planta-mãe, em um meio artificial que contenha nutrientes e hormônios, plantas completas podem ser obtidas, onde as células ou tecidos podem proceder de qualquer parte de uma planta.

Segundo Taiz *et al.* (2017) os hormônios vegetais exercem diversas funções na planta que vão desde a regulação do metabolismo como a ontogênese de órgãos, agindo os mesmos hormônios de diferentes formas, dependendo da região de atuação e da concentração.

Figura 6-Número médio de brotações em explantes de baunilha (*Vanilla bahiana*) em meio de cultura sob diferentes concentrações de fitohormônios (T1-BAP 2,0 mg/l; T2-GA<sup>3</sup> 0,5 mg/l; T3-BAP+GA<sup>3</sup> 2,0 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente; T4-BAP+ANA 2,0 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T5-GA<sup>3</sup>+ANA 0,5 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T6-BAP+GA<sup>3</sup>+ANA 2,0 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l, respectivamente). Em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 30 dias do início das observações.



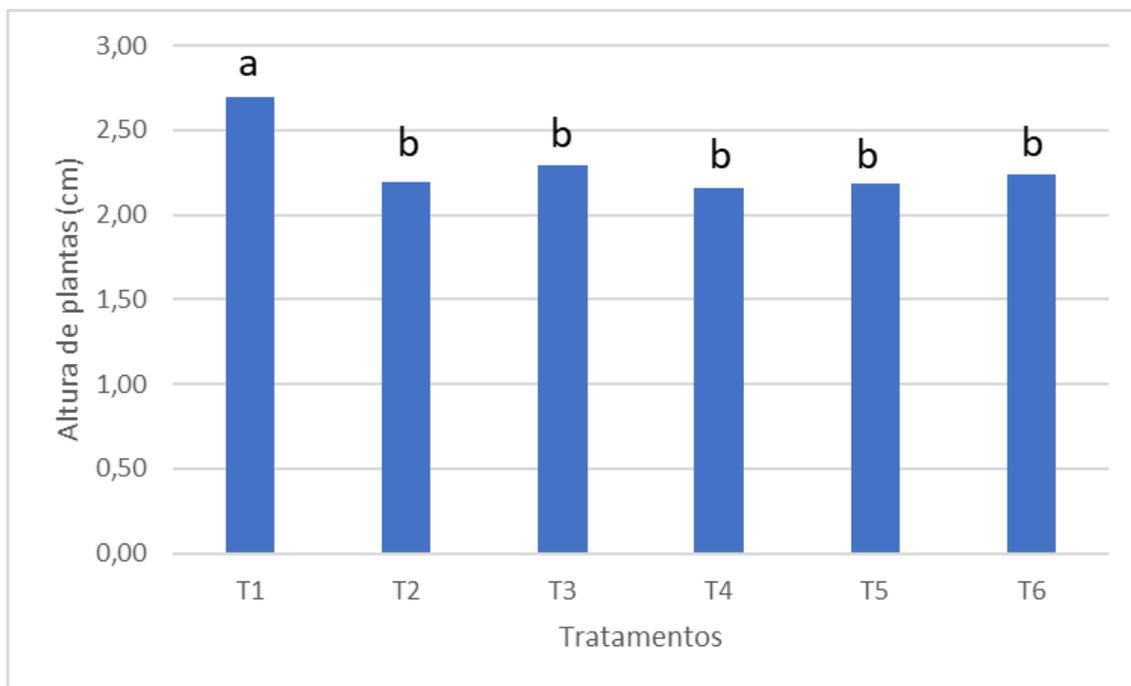
\*Tratamentos com mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Almeida (2023).

Na figura 6, foi observado maior número de brotações no Tratamento 3, com o uso de 2,0 mg/l de BAP + 0,5 mg/l de GA<sup>3</sup>. O que contraria estudo realizado por Graça *et al.* (2013) com uso de BAP e GA<sup>3</sup>, em que o meio que continha apenas BAP apresentou maior número de brotações, o que difere do resultado apresentado em que foi obtido um maior número de brotações no meio de cultura com a presença de 2mg/l de BAP e 0,5mg/l de GA<sup>3</sup>. Houve diferença significativa em T3 e T2 e ainda entre T1, T3, T4, T6 em comparativo com T5, entretanto não houve diferença significativa entre T2 e T5.

Já Lima *et al.* (2007), obteve melhor resposta na combinação de 1mg/l de BAP e 0,5mg/l de ANA, no entanto no presente trabalho não há diferença significativa pelo teste de Tukey nos tratamentos acrescidos ou não de ANA.

O pior desempenho foi observado pela combinação de 0,5 mg/l de GA<sup>3</sup> e 0,25 mg/l de ANA.

Figura 7-Altura de plantas de explantes de baunilha (*Vanilla bahiana*) em meio de cultura sob diferentes concentrações de fitohormônios (T1-BAP 2,0 mg/l; T2-GA<sup>3</sup> 0,5 mg/l; T3-BAP+GA<sup>3</sup> 2,0 mg/l e 0,5 mg/l, respectivamente; T4-BAP+ANA 2,0 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T5-GA<sup>3</sup>+ANA 0,5 mg/l e 0,25 mg/l, respectivamente; T6-BAP+GA<sup>3</sup>+ANA 2,0 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l, respectivamente). Em experimento desenvolvido no laboratório da EMATER-GO, após 30 dias do início das observações.



\*Tratamentos com mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância Fonte: Almeida (2023).

Em relação à altura de plantas, pelo gráfico apresentado na figura 7, é possível observar que T1 apresentou diferença significativa em relação aos outros tratamentos, a utilização de apenas BAP apresentou uma média maior em cm. Ao contrário do resultado obtido por Lima *et al.* (2007) que observou maior altura de plantas de *Mentha viridis* utilizando 2 mg/l de BAP e adição de 0,5 mg/l de ANA.

Assim como Santos *et al.* (2004) não observou aumento do tamanho do explante de *Grevilla robusta* na presença de giberelina (GA<sup>3</sup>), a adição de GA<sup>3</sup> não induziu o crescimento em cm do explante de *Vanilla bahiana* em T2, T3, T5 e T6.

## 6 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados obtidos, conclui-se que:

-Nenhum tratamento com hipoclorito foi efetivo para a descontaminação total dos explantes de baunilha (*Vanilla bahiana*), no entanto, os tratamentos T5- hipoclorito 1,0%, T6- hipoclorito 1,5%, T7- hipoclorito 2,0% e T8- PPM, apresentaram contaminações menos severas e desenvolvimento de estruturas como broto e raiz em alguns explantes, apesar da contaminação.

-Nenhum tratamento apresentou resultado satisfatório em número de raízes dos explantes para os fitohormônios utilizados.

-Os tratamentos não apresentaram diferença significativa em número de folhas nos explantes.

-A utilização de 2,0 mg/l de BAP juntamente com 0,5 mg/l de GA<sup>3</sup> teve melhor resultado na indução de formação de brotação nos explantes.

-A altura de plantas apresentou diferença significativa apenas em T1- 2,0 mg/l de BAP.

-Como um dos objetivos visava a propagação *in vitro* da orquídea *Vanilla bahiana* H., e nesse aspecto o maior número de brotações, o tratamento que melhor atendeu a esse objetivo foi a união de 2,0 mg/l de BAP juntamente com 0,5 mg/l de GA<sup>3</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.V; YARA, R; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesq. agropec. Bras**, v, 40, n, 5, pg. 467-470. 2005.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, pg. 117-138. 1998.
- ANDRADE NASCIMENTO, M.G. *et al.* Organogênese in vitro do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana* a partir de segmentos internodais. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 1075-1078, 2007.
- BRUMANO, C. A.N. **A trajetória social da baunilha do Cerrado na cidade de Goiás/GO**. 2019.
- CARVALHO, J. M. F. C; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).2003
- DAUGSCH, A; PASTOR, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, p. 642-645, 2005.
- DINIZ, J. D. N *et al.* Ácido giberélico (GA3) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento in vitro de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e agrotecnologia**, v. 27, p. 934-938, 2003.
- DINIZ, J. D. N.*et al.* Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento in vitro de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, p. 107-113, 2008.
- HOMMA, A. K. O; DE MENEZES, A. J. E. A; MATOS, G. B. **Cultivo de baunilha: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia**. – Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 2006.
- KUSS, A.V. *et al.* Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesq. agropec. Bras**, v, 42, n, 10, p. 1459-1465. 2007.
- LAMEIRA, O. A. *et al.* **Cultura de tecidos:(manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p.
- MELO, N. F. **Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal**. EMBRAPA, I Seminário Coda de Nutrição Vegetal. 2002.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. Um meio revisado para crescimento rápido e bioensaios com culturas de tecido de tabaco. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473-497. 1962.

MORAIS, T. P; ASMAR, S. A; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo in vitro de Mentha x Piperita L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 350-355. 2014.

NASCIMENTO, T. A. *et al.* Vanilla bahiana Hoehne (Orchidaceae): estudos sobre o desenvolvimento dos frutos e novas perspectivas para o melhoramento de culturas do grupo Vanilla planifolia. **Biota Neotropica**, v. 19. 2019.

NUNES, J. A. **Propagação in vitro da baunilheira (Orchidaceae)**. Tese. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).2013.

PACHECO, L. B; RODRIGUES, M. S. **Controle de bactérias visando à propagação in vitro de pimenteira-do-reino**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém, PA. 2021.

PEREIRA, G. A; BOLIANI, A. C; CORREA, L. S. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira ‘Thap maeo’ (subgrupo AAB) submetidos a concentrações de cloro ativo. **Comunicata Scientiae**, v. 6. 2016.

PETRI, J. L.*et al.* **Reguladores de crescimento para frutíferas de clima temperado**. Florianópolis: Epagri, 141p. 2016,

PINHAL, H. F. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1136-1142. 2011.

SANTOS, D. C; WENDLING, I; GROSSI, F. **Efeito de diferentes combinações de fitorreguladores e vitaminas no desenvolvimento in vitro e ex vitro de Grevillea robusta Cunn.** Comunicado Técnico,112, EMBRAPA. 2004.

SANTOS, M. R. A; SILVA CHAGAS, S. E; GUIMARÃES, M.C. M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (Platonia insignis Mart.). **Saber científico** v. 4, n. 2, p. 10-16, (1982-792X), 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MOLLER, I.M; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, p 858. 2017

ZAVALHIA, L.S; MARSON, C.I; RANGEL, J.O. **Biotecnologia**. Porto Alegre: SAGAH, p. 221.2018.