EFICIÊNCIA DO CLORETO DE MERCÚRIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE SAPUCAIA PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Simone Wellita Simão de Carvalho[1], Vitória Ferreira Gomes[2], Camilly Aparecida Silva Lacerda[4], Maria Alice Brandão Silva[1], Joana Silva Costa[3], Rodrigo Sobreira Alexandre[1,3]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Alto Universitário, s/n, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, simonewellita@gmail.com, alice.gestaoambiental@gmail.com, rodrigosobreiraalexandre@gmail.com

[2]Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Avenida Universitária, 3780, 18610-034, Botucatu - SP, Brasil, vitoriaengfor@gmail.com,

[3]Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Avenida Governador Lindemberg, 316, 29550-000, Jerônimo Monteiro - ES, Brasil, joanasilvacosta9@hotmail.com

[4]Universidade Federal do Espírito Santo, Graduação em Engenharia Florestal, Avenida Governador Lindemberg, 316, 29550-000, Jerônimo Monteiro - ES, Brasil, lacerdaacamilly@gmail.com

Resumo

Lecythis pisonis conhecida como sapucaia, é uma espécie lenhosa de múltiplos usos. É muito apreciada devido as suas castanhas nutritivas ricas em nutrientes essenciais. A principal forma de propagação da espécie é seminífera. Entretanto, com o emprego de outras técnicas, como a cultura de tecidos vegetais, plantas com características de interesse econômico, podem ser clonadas *in vitro* e, assim um protocolo de desinfestação bem estabelecido é o fundamental para o sucesso da propagação *in vitro*. Objetivou-se com este estudo estudar protocolos de desinfestação de segmentos nodais de sapucaia tendo o cloreto de mercúrio como o principal agente desinfestante. Ramos de sapucaia foram coletados e destes foram removidos segmentos nodais contendo uma gema, sendo estes submetidos a protocolos de desinfestação com cloreto de mercúrio 1%. Os protocolos 2, 3 e 4 foram mais eficientes no controle da contaminação fúngica, porém apresentaram oxidação dos tecidos. A contaminação bacteriana persistiu em todos os tratamentos, indicando a necessidade de ajustes nos protocolos de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* de *Lecythis pisonis*.

Palavras-chave: Contaminação. *Lecythis pisonis*. Propagação

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias – Engenharia Florestal

Introdução

Lecythis pisonis Cambess. conhecida como sapucaia, é uma espécie lenhosa de múltiplos usos. É uma angiosperma, pertencente à família Lecythidaceae (Smith, 2026). A sapucaia é muito apreciada devido as suas castanhas nutritivas ricas em nutrientes essenciais para o corpo humano, como os lipídios, proteínas, carboidratos, fibras, ácidos graxos insaturados e selênio (Rosa et al., 2020).

A principal forma de propagação da espécie é realizando a semeadura de suas sementes, as quais apresentam naturalmente uma dormência fisiológica, aliada uma emergência desregular e em alguns casos baixa viabilidade do lote (Lorenzi, 2002; Monteiro, 2015).

Através da técnica de cultura de tecidos vegetais, plantas com características de interesse econômico, podem ser estudadas por meio de ferramentas biotecnológicas *in vitro* para a propagação clonal da espécie (Hou et al., 2020). A cultura de tecidos baseia-se na proliferação e no crescimento de tecidos ou órgãos vegetais em ambiente estéril e controlado (Gu et al., 2022).

Um protocolo de desinfestação bem estabelecido, que garanta a assepsia completa do material é o ponto chave para o sucesso da propagação *in vitro* (Kang et al., 2020). Para isto, o uso de produtos como etanol, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, antibióticos, fungicidas, peróxido de hidrogênio, nitrato de prata, cloreto mercúrio, dentre outros, são utilizados com frequência no cultivo *in vitro*, apesar de alguns apresentar um certo grau de toxicidade tanto para os animais como para os vegetais, utilizando da forma correta com os devidos equipamentos de proteção e na concentração adequada tornam-se efetivos contra a contaminação sem matar os tecidos vegetais (Eliwa et al., 2024; Dincer et al., 2026). Portanto, objetivou-se com este estudo analisar protocolos de desinfestação de segmentos nodais de sapucaia tendo o cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) como agente principal.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAE-UFES), no município de Jerônimo Monteiro - ES.

Ramos foram coletados em uma planta matriz de *Lecythis pisonis* localizada no município de Jerônimo Monteiro – ES (20°47' S e 41°23' W) e transportadas dentro de caixas térmicas, até o laboratório onde foi realizado o preparo dos explantes, sendo utilizados segmentos nodais contendo uma gema, e estes submetidos aos seguintes tratamentos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Protocolos de desinfestação de sementes de *L. pisonis Cambess.*

Protocolos	Descrições
1	Álcool 70% / 1 minuto + 3 lavagens em água destilada autoclavada + $HgCl_2$ 1% / 5 minutos + 5 lavagens em água destilada autoclavada
2	Álcool 70% / 1 minuto + 3 lavagens em água destilada autoclavada + $HgCl_2$ 1% / 10 minutos + 5 lavagens em água destilada autoclavada
3	Álcool 70% / 1 minuto + 3 lavagens em água destilada autoclavada + $HgCl_2$ 1% / 5 minutos + 5 lavagens em água destilada autoclavada + Across 2 mL/L / 20 minutos, deixando o explante com resíduo
4	Álcool 70% / 1 minuto + 3 lavagens em água destilada autoclavada + $HgCl_2$ 1% / 10 minutos + 5 lavagens em água destilada autoclavada + Across 2mL/L / 20 minutos, deixando o explante com resíduo

Fonte: elaborado pela própria autora.

Tubos de ensaio foram preparados e autoclavados, contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L^{-1} de mioinositol (Sigma-Aldrich®), 1 g L^{-1} de PVP (Synth®), 5,5 g L^{-1} de ágar (Kasvi®), e pH ajustado a 5,7 ± 0,1.

Na câmara de fluxo laminar, foram testados os quatro protocolos de desinfestação. Após esta etapa os segmentos foram estabelecidos nos tubos de ensaio contendo o meio de cultura, os quais foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 60 µmol m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo de 8/16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C.

O experimento foi realizado com 4 tratamentos de 4 repetições de 10 segmentos cada, totalizando 40 explantes por tratamento. Sete dias após o estabelecimento foi calculado a porcentagem de contaminação.

Resultados

A porcentagem de contaminação seria avaliada aos quatorze dias após o estabelecimento, entretanto, após sete dias do estabelecimento dos explantes, foi possível observar que todos os tratamentos apresentaram contaminação e oxidação (Tabela 2).

Tabela 2. Contaminação (%) e desvio padrão de sementes de *Lecythis pisonis* Cambess. submetidas à desinfestação com $HgCl_2$.

Protocolo	Bactéria	Fungo	Oxidação
1	20 ± 0	17,5 ± 5	0 ± 0
2	20 ± 0	2,5 ± 5	25 ± 5,8
3	20 ± 0	2,5 ± 5	25 ± 5,8
4	27,5 ± 5	0 ± 0	27,5 ± 5

Fonte: elaborado pela própria autora.

Todos os protocolos testados apresentaram apartir de 20% de contaminação por bactérias. O protocolo 1, apresentou a maior porcentagem de contaminação por fungos e não apresentou oxidação dos tecidos. Os protocolos 2, 3 apresentaram baixa porcentagem de contaminação por fungos, enquanto o protocolo 4, não registrou nenhuma contaminação fúngica, entretanto, houve a oxidação dos tecidos nos três últimos protocolos testados a partir de 25% (Tabela 1).

Discussão

Um dos principais problemas do cultivo *in vitro* é encontrar um protocolo de desinfestação eficiente, uma vez que o processo de contaminação ocorre naturalmente, o que pode exigir mais testes para algumas espécies (Gammoudi *et al*., 2022). O cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) tem apresentado boas taxas de controle de contaminação em algumas espécies (Dutra; Hansel; Wendling, 2008). Como registrado por Gu et al. (2022), ao aplicar o $HgCl_2$ a 0,1% por 10 minutos, obtiveram uma taxa de sobrevivência 44,44% nos segmentos de caule de *C. aconitifolius* bienal.

Kang et al. (2020), encontraram resultados superiores ao utilizar o etanol a 75% por 30 segundos, brometo de benzalcônio a 1% por 5 min e $HgCl_2$ a 0,1% por 5 min, o que proporcionou uma taxa de sobrevivência dos explantes de 78%. Os autores relataram ainda que ao utilizar o $HgCl_2$ a 0,1% por 7 min, os explantes foram perdidos. É possível observar que o $HgCl_2$ apresenta um bom potencial desinfestante, e que provavelmente a concentração testada para os explantes de sapucaia, foi mais letal para os tecidos do que para os microrganismos ali presentes.

Conclusão

Os protocolos 2, 3 e 4 foram mais eficientes no controle da contaminação fúngica, porém apresentaram oxidação dos tecidos. A contaminação bacteriana persistiu em todos os tratamentos, indicando a necessidade de ajustes nos protocolos de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* de *Lecythis pisonis*.

Referências

DINCER, D.; DÜNDAR, H.; BEKİRYAZICI, F.; EMİNOĞLU, A.; GÜZEL İZMİRLİ, Ş.; BERİŞ, F. Ş.; YAZICI, K. A low-toxicity surface sterilization approach for efficient *in vitro* propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using alternative antifungal agents. **South African Journal of Botany,** v. 188, p. 180-190, 2026.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). 2008.

GAMMOUDI, N.; NAGAZ, K.; FERCHICHI, A. Establishment of optimized in vitro disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi− objective genetic algorithm. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 324, 2022.

GU, M.; LI, Y.; JIANG, H.; ZHANG, S.; QUE, Q.; CHEN, X.; ZHOU, W. Efficient in vitro sterilization and propagation from stem segment explants of *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst, a multipurpose woody plant. **Plants**, v. 11, n. 15, p. 1937, 2022.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.1, 368 p.

KANG, L.; ZHENG, K.; XIE, Y.; DENG, Y.; YU, Y.; ZHU, M.; XI, R.; DENG, X. Efficient tissue culture protocol for *Magnolia lucida* (Magnoliaceae) and confirmation of genetic stability of the regenerated plants. **Plants**, v. 9, n. 8, art. 997, 2020.

MONTEIRO, T. L. **Divergência genética em sapucaia baseada em características juvenis**. Monografia de conclusão de curso. 2015. Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro. 27 p. 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

ROSA, T. L. M.; ARAÚJO, C. P.; KAMKE, C.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S.; BESTETE, J. P.; SCHMILDT, E. R.; LOPES, J. C.; MENGARDA, L. H. G.; OTONI, W. C.; SANTOS, A. R.; ALEXANDRE, R. S. Sapucaia nut: Morphophysiology, minerals content, methodological validation in image analysis, phenotypic and molecular diversity in *Lecythis pisonis* Cambess. **Food Research International**, v. 137, p. 109383, 2020.

Smith, N.P. *Lecythis in* **Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB8561>. Acesso em: 16 de ago. 2026.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e inovação do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa de estudos - EDITAL FAPES Nº 12/2021 - PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS NA PÓS-GRADUAÇÃO - DOUTORADO (PROCAP 2022 – DOUTORADO).

Ao CNPq - Chamada CNPq Nº 09/2022 - Bolsas de Produtividade em Pesquisa (Sementes zigóticas e sintéticas de castanheiras-do-Brasil na conservação sexuada e assexuada deste patrimônio genético inexplorado).

À FAPES - EDITAL FAPES Nº 21/2022 APOIO À INFRAESTRUTURA DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO EM LABORATÓRIOS INTERDISCIPLINARES (Laboratório Interdisciplinar de Ciências do Espírito Santo (LICES)) e EDITAL FAPES Nº 03/2021 – UNIVERSAL (Conservação/criopreservação *ex situ* de embriões zigóticos e somáticos das castanheiras *Lecythis pisonis* e *Lecythis lanceolata*).