

## Desinfestação, propagação *in vitro* e subcultivo de *Pereskia aculeata* Mill

Disinfestation, *in vitro* propagation and subculture of *Pereskia aculeata* Mill

Desinfestación, propagación *in vitro* y subcultivo de *Pereskia aculeata* Mill

Recebido: 20/09/2022 | Revisado: 03/10/2022 | Aceitado: 08/10/2022 | Publicado: 13/10/2022

### Karine Bordignon

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4101-8605>  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil  
E-mail: [bordignon\\_karine@yahoo.com.br](mailto:bordignon_karine@yahoo.com.br)

### Jordana Caroline Nagel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6876-3838>  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil  
E-mail: [jordananagel@san.uri.br](mailto:jordananagel@san.uri.br)

### Laura Reisdörfer Sommer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7735-8188>  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil  
E-mail: [laurasommer@san.uri.br](mailto:laurasommer@san.uri.br)

### Natália Heinzmann

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1594-0332>  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil  
E-mail: [nataliaheinzmann12@gmail.com](mailto:nataliaheinzmann12@gmail.com)

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a desinfestação, propagação *in vitro* e subcultivo de ora-pro-nóbis. No primeiro experimento, realizou-se a desinfestação dos explantes com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (2%, 4%, 6%). No segundo, foi realizada a propagação de 600 segmentos nodais, sob diferentes concentrações de meio MS (MS, MS/2, MS/4) e combinações de fitorreguladores: 1) ANA (0,5µM) + BAP (0,5µM); 2) ANA (0,5µM) + BAP (1,0µM); 3) ANA (0,5µM) + BAP (1,5µM); 4) ANA (0,5µM) + BAP (2,0µM); 5) ANA (0,5µM), com e sem adição de carvão ativado. No terceiro, foi realizado o subcultivo em meio MS a partir dos calos desenvolvidos no segundo experimento, submetidos a três tratamentos: T1 - ANA (2µM) + BAP (4µM); T2 - ANA (0,1µM) + BAP (1µM) e T3 - ANA (0,5µM). A concentração de 4% de NaClO foi mais eficiente, apresentando 5% de contaminação. As maiores taxas de multiplicação de calos foram observadas em meio MS/2 sem adição de carvão, suplementado com 0,5µM de ANA e diferentes concentrações de BAP (1,0µM, 1,5µM e 2,0µM) com médias de 0,85 e 0,80 calos por tratamento. Em 47,16% dos explantes ocorreram contaminações fúngicas e bacterianas e 23,5% oxidação. Há a necessidade de desenvolver protocolos para o estabelecimento da ora-pro-nóbis *in vitro* como, por exemplo, alternativas para controle da oxidação, contaminação e concentrações adequadas dos reguladores de crescimento.

**Palavras-chave:** Ácido 1-naftalenoacético; 6-benzilaminopurina; Segmento nodal; Carvão ativado; Ora-pro-nóbis.

### Abstract

The objective of this work was to evaluate the disinfestation, *in vitro* propagation and subculture of ora-pro-nóbis. In the first experiment, the explants were disinfested with different concentrations of sodium hypochlorite (2%, 4%, 6%). In the second, 600 nodal segments were propagated under different concentrations of MS medium (MS, MS/2, MS/4) and combinations of phyto regulators: 1) ANA (0.5µM) + BAP (0.5µM); 2) ANA (0.5µM) + BAP (1.0µM); 3) ANA (0.5µM) + BAP (1.5µM); 4) ANA (0.5µM) + BAP (2.0µM); 5) ANA (0.5µM), with and without addition of activated carbon. In the third, subculture was carried out in MS medium from the calluses developed in the second experiment, submitted to three treatments: T1 - ANA (2µM) + BAP (4µM); T2 - ANA (0.1µM) + BAP (1µM) and T3 - ANA (0.5µM). The concentration of 4% of NaClO was more efficient, presenting 5% of contamination. The highest callus multiplication rates were observed in MS/2 medium without addition of charcoal, supplemented with 0.5µM of ANA and different concentrations of BAP (1.0µM, 1.5µM and 2.0µM) with means of 0.85 and 0.80 callus per treatment. In 47.16% of the explants there was fungal and bacterial contamination and 23.5% oxidation. There is a need to develop protocols for the establishment of ora-pro-nóbis *in vitro* as, for example, alternatives to control oxidation, contamination and adequate concentrations of growth regulators.

**Keywords:** 1-naphthaleneacetic acid; 6-benzylaminopurine; Nodal segment; Activated charcoal; Ora-pro-nóbis.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la desinfestación, propagación *in vitro* y subcultivo de ora-pro-nóbis. En el primer experimento, los explantes fueron desinfestados con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (2%, 4%, 6%). En el segundo, se propagaron 600 segmentos nodales bajo diferentes concentraciones de medio MS (MS,

MS/2, MS/4) y combinaciones de fitorreguladores: 1) ANA (0,5 µM) + BAP (0,5 µM); 2) ANA (0,5 µM) + BAP (1,0 µM); 3) ANA (0,5 µM) + BAP (1,5 µM); 4) ANA (0,5 µM) + BAP (2,0 µM); 5) ANA (0,5 µM), con y sin adición de carbón activado. En el tercero, se realizó un subcultivo en medio MS a partir de los callos desarrollados en el segundo experimento, sometidos a tres tratamientos: T1 - ANA (2 µM) + BAP (4 µM); T2 - ANA (0,1 µM) + BAP (1 µM) y T3 - ANA (0,5 µM). La concentración de 4% de NaClO fue más eficiente, presentando 5% de contaminación. Las mayores tasas de multiplicación de callos se observaron en medio MS/2 sin adición de carbón vegetal, suplementado con ANA 0,5 µM y diferentes concentraciones de BAP (1,0 µM, 1,5 µM y 2,0 µM) con medias de 0,85 y 0,80 callos por tratamiento. En el 47,16% de los explantes hubo contaminación fúngica y bacteriana y en el 23,5% oxidación. Existe la necesidad de desarrollar protocolos para el establecimiento de ora-pro-nóbis *in vitro* como, por ejemplo, alternativas para el control de oxidación, contaminación y concentraciones adecuadas de reguladores de crecimiento.

**Palabras clave:** Ácido 1-naftalenoacético; 6-bencilaminopurina; Segmento nodal; Carbón activado; Ora-pro-nóbis.

## 1. Introdução

A Ora-pro-nóbis é uma planta perene pertencente à família das cactáceas, que se desenvolve em diversas regiões do Brasil. É uma das únicas espécies que possui folhas verdadeiras e potencial para uso alimentar como hortaliça não convencional (Botrel et al., 2017). Possui características agrônômicas favoráveis ao seu cultivo sendo uma planta rústica, vigorosa e de fácil propagação (Tofanelli et al., 2011), além de sobreviver a longos períodos de seca, chuvas em excesso e geadas severas. Possui grande fonte de substâncias bioativas que conferem alto valor proteico e nutricional (Silva, et al., 2010). A proteína da ora-pro-nóbis apresenta valor biológico, sendo diretamente relacionado a sua composição de aminoácidos (Legnaioli, 2021).

Segundo Madeira et al. (2016), ainda não existem variedades registradas de *Pereskia aculeata*, mas ocorre a manutenção de clones locais, observando-se diferenças morfológicas especialmente em relação à coloração dos brotos (verde-claro, verde-escuro ou pigmentados, amarelados ou avermelhados) e formato das folhas (comprimento, largura e espessura). Por ser uma planta de fácil cultivo e propagação também é chamada de “carne de pobre” tendo grande uso e importância medicinal (Girão et al., 2003). Nos locais onde se desenvolve, é amplamente explorada, seja na forma *in natura* ou processada (desidratada e moída).

Sobre a distribuição geográfica, foram confirmadas as regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (Flora do Brasil, 2020). Seu habitat natural são as florestas tropicais e seu cultivo é encontrado em espaços domésticos no meio rural e urbano. Por ser rica em nutrientes recomendados para dieta alimentar, como sais minerais, vitaminas e proteínas, pode ser consumida *in natura* (crua) ou processada, além de não apresentar nenhuma toxicidade, o que favorece seu consumo (Souza, 2013).

A micropropagação é uma técnica aplicada na cultura de tecidos vegetais, sendo amplamente utilizada na produção de mudas em escala comercial (Hussain et al., 2012). Com o uso dessa técnica é possível obter um grande número de mudas em tempo e espaço reduzidos, podendo ser conduzida a partir da multiplicação de zonas meristemáticas pré-existentes, como gemas axilares, ápices caulinares, através de organogênese direta, por indução de gemas adventícias a partir de regiões meristemáticas, formadas diretamente nos tecidos ou por organogênese indireta, onde é precedida a formação de calos (Angulo-Bejarano & Paredes-López, 2011). Segundo Malda et al. (1999), as cactáceas cultivadas *in vitro* podem fixar CO<sub>2</sub> de maneira contínua, se comportando como plantas C3 facultativas favorecendo seu crescimento.

O cultivo de plantas de fácil implemento e baixo custo para produção de alimentos pode ser uma forma interessante na alimentação humana, principalmente para populações que sobrevivem em situações de pobreza e carência nutricional. A biotecnologia vegetal apresenta-se como uma eficiente alternativa na conservação *in vitro* de germoplasma de muitas espécies, utilizando diversas técnicas de cultura de tecidos vegetais (Santos et al., 2001; Shukla et al., 2012). Devido a isso, é de grande relevância o estudo de técnicas de desinfestação e de propagação *in vitro* para esta espécie. Essas técnicas são modernas no ramo da biotecnologia e vem sendo cada vez mais utilizadas para o melhoramento genético de plantas, o que permite a

multiplicação de plantas em curto espaço de tempo, garantindo qualidade, em vista de ser um cultivo em ambiente controlado, evitando possíveis estresses adversos ao seu cultivo (Pereira et al., 2011).

A utilização de fitoreguladores vegetais, tem sido eficiente para o desenvolvimento de espécies vegetais multiplicadas *in vitro*. Os grupos hormonais mais conhecidos são: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, jasmonatos, brassinosteróides e salicilatos (Basra, 2000). Essas substâncias são produzidas em baixas concentrações pelas plantas, por isso, seu uso tem sido realizado para promover, retardar ou inibir crescimento vegetativo ou florescimento, diminuir a frutificação efetiva, aumentar o tamanho dos frutos, controlar a maturação e a senescência, promover enraizamento e quebrar a dormência de sementes (Melo, 2002).

O uso de auxinas reguladoras de crescimento vegetal como o ácido naftalenoacético (ANA) proporciona a indução e formação de raízes e calos. Sendo utilizado em diversas técnicas para o enraizamento de plantas, tendo papel importante em protocolos de cultivo *in vitro* (Cid & Teixeira, 2010.; Mercier, 2012). A utilização de citocininas como o 6-benzilaminopurina (BAP) induz a proliferação de brotações ou calos. Seus principais efeitos são conferir a divisão celular, morfogênese, quebra da dormência apical, expansão foliar, abertura estomática, aumento da clorofila e retardo na senescência foliar (Melo, 2002). Atua também na proliferação de gemas axilares e no desenvolvimento de parte aérea (Moura et al., 2012).

Uma das principais problemáticas do cultivo *in vitro* é o controle e a prevenção de contaminações por microrganismos. Ainda existem aspectos que devem ser investigados com o objetivo de melhorar a eficiência da micropropagação por meio do estudo de alguns fatores envolvidos nas etapas de desinfestação, obtenção de calos e enraizamento dessa espécie. Desta forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de desinfestação e propagação *in vitro* de *P. aculeata*.

## 2. Metodologia

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitotecnia do curso de Agronomia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Campus de Santo Ângelo, durante os meses de dezembro de 2021 a junho de 2022.

O material vegetal utilizado no experimento estava acondicionado em recipientes plásticos de polipropileno preto Nutriplan®, com volume de 25 litros, em casa de vegetação com estrutura metálica, coberta com filme de polietileno de baixa densidade (150µm de espessura) e sob condições de temperatura e ventilação parcialmente controladas. Esta pesquisa foi realizada em três experimentos descritos abaixo.

O trabalho possui natureza quantitativa e para a avaliação do desenvolvimento dos explantes dos segmentos nodais utilizou-se o trabalho de Dill (2014), com adaptações. No primeiro experimento foram utilizados tubos de ensaio, preparados com 15 ml de meio de cultivo por tubo. O meio de cultivo utilizado foi ágar bacteriológico, na concentração de 7g/L<sup>-1</sup> diluído com água destilada e autoclavado a 120° C e 1,5 atm de pressão durante 20 minutos para descontaminação do material. Após a autoclavagem, os tubos com o meio de cultura foram encaminhados para a câmara de fluxo laminar, onde permaneceram por 20 minutos sob luz ultravioleta para garantir melhor assepsia.

Após a assepsia do material, foram coletados 60 segmentos nodais com aproximadamente 2cm de comprimento, os quais passaram por diferentes etapas de desinfestação. Inicialmente foram mergulhados em Kasumin®, na proporção de 2 ml/L<sup>-1</sup>, sendo agitados durante 20 minutos em béqueres de 100 ml. Posteriormente, os explantes foram levados para a câmara de fluxo laminar onde foram imersos em álcool 70% sob agitação por dois minutos. Em seguida foram submetidos aos tratamentos compostos por embebição nas soluções de hipoclorito de sódio (NaClO) nas concentrações de 2%, 4% e 6% com tempo de imersão de 10 minutos.

Ao final de cada imersão, os segmentos foram lavados três vezes com água destilada autoclavada e imediatamente inoculados nos tubos de ensaio. Após a inoculação, os tratamentos foram mantidos em estufa incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) em temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. Foram avaliadas as porcentagens de contaminações fúngicas e bacterianas.

No segundo experimento foi realizada a propagação vegetativa dos segmentos nodais, em delineamento experimental inteiramente casualizado com 30 tratamentos sob diferentes concentrações de meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) Basal Sigma Aldrich®, acrescidos de diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 1). Cada tratamento foi constituído por 20 tubos de ensaio, totalizando 600 tubos.

**Tabela 1.** Número de tratamentos com as respectivas concentrações de meio de cultura reguladores de crescimento e presença ou ausência de carvão ativado.

TRATAMENTOS	
1	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA* + 0,5 $\mu\text{M}$ BAP*
2	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 0,5 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
3	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,0 $\mu\text{M}$ BAP
4	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,0 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
5	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,5 $\mu\text{M}$ BAP
6	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,5 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
7	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 2,0 $\mu\text{M}$ BAP
8	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 2,0 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
9	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA
10	MS + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + Carvão ativado
11	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 0,5 $\mu\text{M}$ BAP
12	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 0,5 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
13	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,0 $\mu\text{M}$ BAP
14	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,0 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
15	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,5 $\mu\text{M}$ BAP
16	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,5 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
17	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 2,0 $\mu\text{M}$ BAP
18	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 2,0 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
19	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA
20	MS/2 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + Carvão ativado
21	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 0,5 $\mu\text{M}$ BAP
22	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 0,5 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
23	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,0 $\mu\text{M}$ BAP
24	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,0 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
25	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,5 $\mu\text{M}$ BAP
26	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 1,5 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
27	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 2,0 $\mu\text{M}$ BAP
28	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + 2,0 $\mu\text{M}$ BAP + Carvão ativado
29	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA
30	MS/4 + 0,5 $\mu\text{M}$ ANA + Carvão ativado

\*ANA: Ácido 1-naftalenoacético; BAP: 6-benzilaminopurina. Fonte: Karine Bordignon.

Além dos sais e vitaminas característicos do meio de cultivo, adicionou-se ágar bacteriológico na concentração de  $7\text{g/L}^{-1}$  e  $30\text{g/L}^{-1}$  de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, em seguida, realizou-

se a autoclavagem. Foram avaliados presença ou ausência de calos, raízes e brotações como também porcentagem de oxidação e contaminação dos explantes.

Como uma subetapa do segundo experimento foram testados a presença (20 tubos de ensaio) e a ausência (20 tubos de ensaio) de carvão ativado, na proporção de 2 g/L de meio de cultura. Após a inoculação dos explantes, os mesmos foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro, permanecendo nessas condições por 60 dias. Foram avaliadas contaminações fúngicas e bacterianas, oxidações, formação de calos, além de determinar em qual concentração de meio e hormônios vegetais ocorreu o melhor desenvolvimento dos segmentos nodais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey com 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

No terceiro experimento, aos 60 dias, foi realizado o subcultivo em meio MS a partir dos calos desenvolvidos no segundo experimento. Os subcultivos foram submetidos a três tratamentos: T1 - ANA ( $2\mu\text{M}$ ) + BAP ( $4\mu\text{M}$ ); T2 - ANA ( $0,1\mu\text{M}$ ) + BAP ( $1\mu\text{M}$ ) e T3 - ANA ( $0,5\mu\text{M}$ ). Os calos foram multiplicados e distribuídos em 45 placas de Petri contendo 3 fragmentos por placa, totalizando 135 fragmentos. Estes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro, durante 15 dias.

### 3. Resultados e Discussão

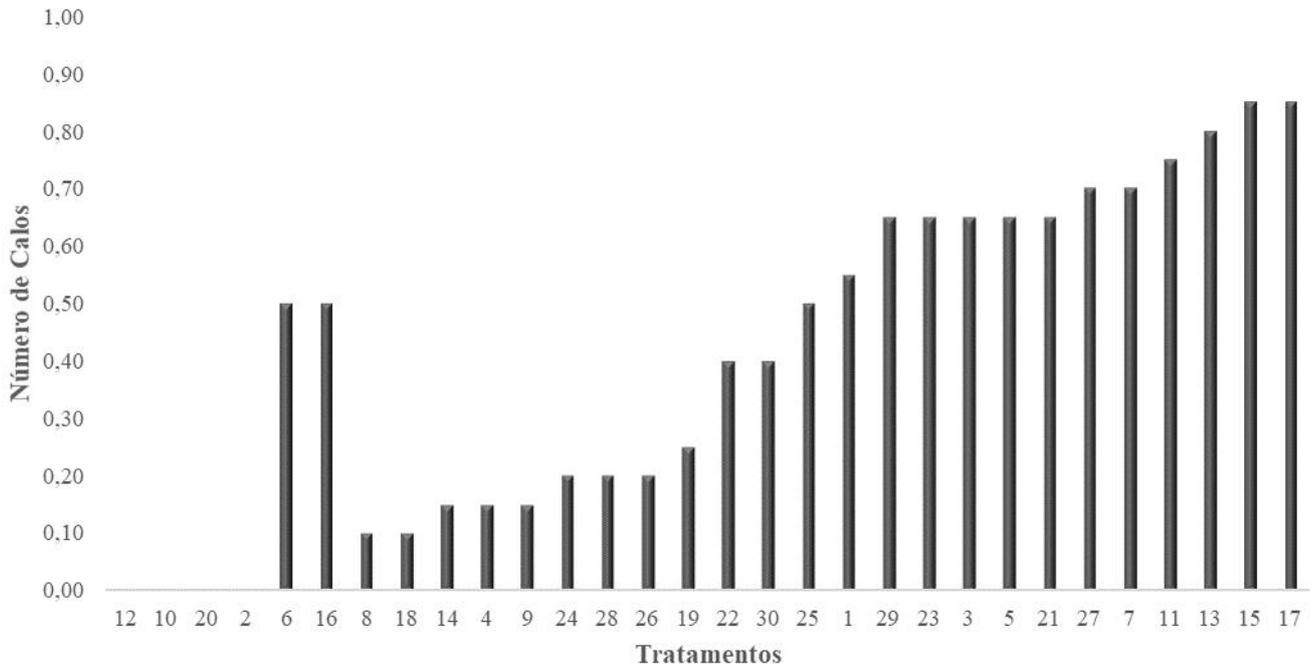
No primeiro experimento, após a primeira semana de avaliação, observou-se a ocorrência de contaminação em 5% dos explantes na concentração de 2% de NaClO. Nas concentrações de 4% e 6% não houveram contaminações. Após 21 dias, ocorreu o aumento de contaminações nos explantes na concentração de 2% de NaClO (15%), as concentrações de 4% e 6% mantiveram-se com mesma porcentagem. Aos 28 dias, 20% dos explantes (2% de NaClO) apresentaram contaminações, as concentrações 4% e 6% mantiveram-se com as porcentagens de 5% e 0%, respectivamente.

O tratamento com a concentração de 6% não apresentou contaminações, porém ocorreu a despigmentação dos explantes, provavelmente devido à alta concentração de hipoclorito de sódio, tornando-se inviável para o uso no segundo experimento. Souza et al. (2011), em experimento com desinfestação de segmentos apicais de *Myrcianthes pungens* sob diferentes concentrações de NaClO (0%, 4%, 6% e 8%), verificou a ocorrência de 100% de contaminação no tratamento com a concentração de 0% e nos demais tratamentos, não houve diferença significativa entre as concentrações. Esse problema de contaminação foi superado com solução biocida (García-Saucedo et al., 2005) ou água oxigenada (30%) (Rodriguez & Ramirez-Pantoja, 2020) em combinação com etanol e alvejante comercial. Chornobrov e Bilous (2021) conseguiram o estabelecimento de culturas assépticas *Schlumbergera truncata* (Cactaceae), com mais de 90% de explantes descontaminados usando uma solução hidroalcoólica de álcool etílico (70:30 v/v), seguido de submersão de 0,1% de solução de cloreto de mercúrio.

No segundo experimento, no que diz respeito à presença ou ausência de brotações não foi possível observar diferença estatística significativa entre os tratamentos com diferentes concentrações de reguladores de crescimento, meios de cultura e adição ou não de carvão ativado. Para a presença ou ausência de raízes nos explantes, também não houve diferença significativa, observando-se que a adição de BAP influenciou negativamente nesse aspecto, uma vez que os maiores índices de enraizamento ocorreram na ausência de BAP e em concentrações menores do hormônio (T10 – 9,5%, T11 – 2%, T12 – 3%, T13 – 3,5%, T14 – 2% e T15 – 2,5%). Segundo Santana et al. (2006), tal fato normalmente ocorre porque essa citocinina é inibidora de sistema radicular, sendo que a indução ou inibição dependerão do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógeno e exógeno. Rocha et al. (2021) avaliando as variações de concentração do ácido indolbutírico (AIB) perceberam que houve relação entre a aplicação das doses de 2000 e 4000 mg L<sup>-1</sup> tanto para o número de raízes quanto para o comprimento da maior raiz nos experimentos em diferentes tipos de estacas de *P. aculeata*.

Com relação à presença ou ausência de calos nos explantes foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos suplementados com fitorreguladores ANA e BAP, relacionadas à produção de calos pelos explantes. As maiores taxas de multiplicação de calos ( $P>0,05$ ) foram observadas quando foram utilizados os meios de cultura MS/2 sem adição de carvão, suplementado com BAP nas concentrações de  $1,0\mu\text{M}$  (T13),  $1,5\mu\text{M}$  (T15) e  $2,0\mu\text{M}$  (T17) e ANA  $0,5\mu\text{M}$ , com médias de 0,85 e 0,80 calos por tratamento (Figura 1).

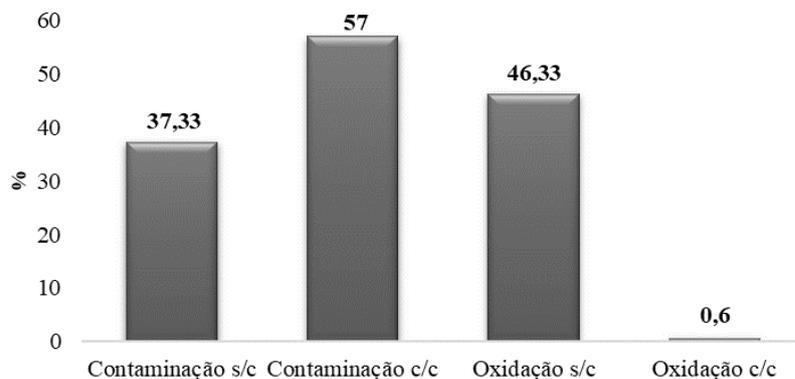
**Figura 1.** Número de calos de *P. aculeata* formados nos explantes sob os diferentes tratamentos analisados.



Fonte: Karine Bordignon.

Na subetapa do segundo experimento, o processo oxidativo ocorreu nos tratamentos após as cinco primeiras semanas de cultivo. No tratamento sem carvão ativado, 37,33% dos explantes apresentaram contaminação e 46,33% oxidação. Nos tratamentos com carvão ativado, em 57% dos explantes ocorreu contaminação e em 0,6 % oxidação (Figura 2).

**Figura 2.** Porcentagem média de contaminação por fungos e bactérias e oxidação dos explantes sem carvão (s/c) e com carvão (c/c), em resposta ao estabelecimento *in vitro* de *P. aculeata*.



Fonte: Karine Bordignon.

A ocorrência do processo oxidativo pode ser proveniente da liberação de exsudatos do próprio explante, o que se relaciona com a liberação de compostos fenólicos pelo explante após a realização de “ferimentos” para sua inoculação (Santos, et al. 2001). Segundo Souza et al. (2011) em trabalho de propagação *in vitro* de *Melocatus oreas*, quando são utilizados segmentos retirados de planta matriz, podem ocorrer contaminações significativas por microrganismos saprófitos, que podem comprometer o desenvolvimento dos explantes.

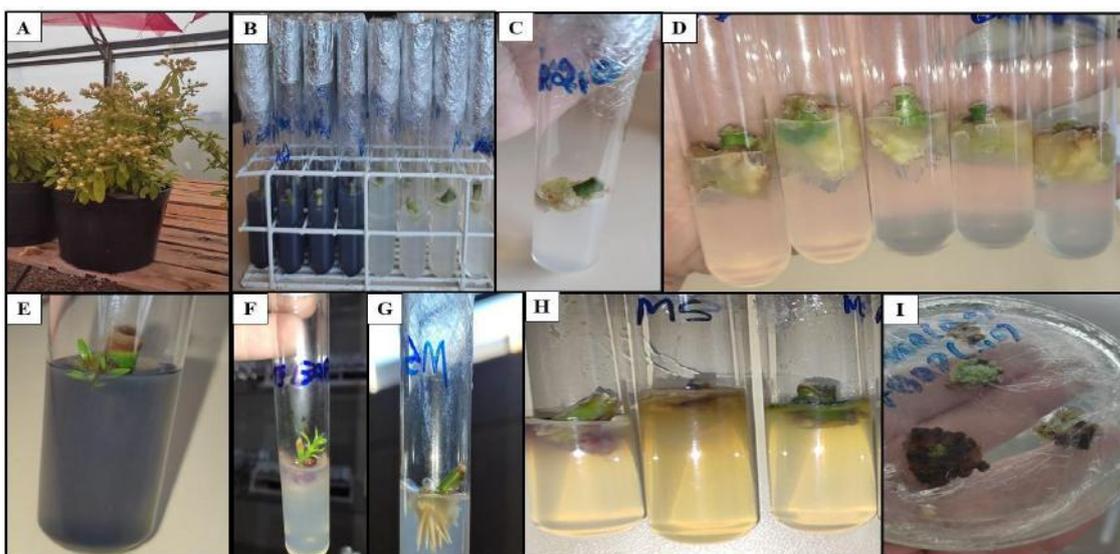
A utilização de carvão ativado em todos os tratamentos demonstrou pouco ou nenhum desenvolvimento dos explantes. Porém, nos tratamentos sem suplementação de carvão ativado foi observado ao decorrer do experimento, o desenvolvimento significativo de calos (organogênese indireta). A organogênese indireta foi implementada com sucesso para várias espécies de cactos como *Astrophytum asterias*, *Ariocarpus kotschoubenyanus*, *Blossfeldia liliputiana*, *Strombocactus disciformis*, *Coryphantha elefanteidens*, *Mammillaria elongata*, *Mammillaria gracilis*, *Mammillaria mathildae*, *Mammillaria pectinifera*, *Escobaria minima* e *Pelecypora aselliformis* (Wakhlu & Bhau, 2000; Papafotiou et al., 2001; Giusti et al., 2002; Poljuha et al., 2003; del Socorro Santos-Díaz et al., 2006; Garcia-Rubio & Malda-Barrera, 2010; Ivannikov et al., 2021).

A utilização de carvão ativado vem crescendo no cultivo *in vitro* devido suas características antioxidantes de adsorver substâncias fitotóxicas que podem ser produzidas pelo próprio explante, minimizando o efeito oxidativo de espécies vegetais (Guerra et al., 2016). O carvão ativado também apresenta capacidade de absorver nutrientes do meio de cultura, o que prejudica o desenvolvimento normal dos explantes (Grattapaglia & Machado, 1998; Aloufa, 2007).

No terceiro experimento, os explantes de *P. aculeata* mostraram capacidade de multiplicação após o subcultivo. Aos 14 dias, constatou-se a presença de contaminação e oxidação em todos os tratamentos. Dessa forma, não se obtiveram resultados para a realização da análise estatística. Para Cordeiro et al. (2015), Castro (2015) e Moraes (2015) a persistência dos explantes iniciais é fundamental para manter a capacidade de multiplicação durante os subcultivos.

Para facilitar o entendimento dos resultados a figura abaixo mostra a execução de todas as etapas do experimento, desde o estabelecimento *in vitro* até a realização dos subcultivos (Figura 3).

**Figura 3.** Cultivo *in vitro* de *P. aculeata* A) Planta matriz cultivada em vaso em estufa agrícola; B) Segmentos nodais estabelecidos em condições assépticas, após 1 semana de cultivo; C) Início da indução de calos em meio de cultura MS suplementado com BAP ( $2\mu\text{M}$ ), após 3 semanas de cultivo; D) Indução de calos cultivados em meio de cultura MS suplementado com BAP ( $2\mu\text{M}$ ), após 5 semanas de cultivo; E-F) Desenvolvimento de brotos em meio de cultura MS/2 suplementado com carvão e ANA ( $0,5\mu\text{M}$ ) e sem carvão com ANA ( $0,5\mu\text{M}$ ) + BAP ( $2,0\mu\text{M}$ ), após 5 semanas de cultivo; G) Desenvolvimento de raízes em meio de cultura MS suplementado com ANA ( $0,5\mu\text{M}$ ), após 6 semanas; H) Início do processo oxidativo em meio MS suplementado com ANA ( $0,5\mu\text{M}$ ), após 7 semanas; I) Início do processo oxidativo em subcultivos após uma semana de inoculação.



Fonte: Karine Bordignon.

#### 4. Conclusão

A concentração de 4% NaClO foi a que apresentou melhor desempenho na desinfestação de explantes de ora-pro-nóbis. Os tratamentos com meio de cultura MS/2 sem adição de carvão, suplementado com BAP nas concentrações de  $1,0\mu\text{M}$  (T13),  $1,5\mu\text{M}$  (T15) e  $2,0\mu\text{M}$  (T17) e ANA  $0,5\mu\text{M}$  foram os que apresentaram as maiores taxas de multiplicação de calos. O índice de contaminação foi menor sem a presença de carvão ativado, porém, o percentual de oxidação foi menor na presença de carvão ativado. Os explantes de *P. aculeata* mostraram capacidade de multiplicação após o subcultivo, porém devido à contaminação e oxidação não se obtiveram resultados.

Em estudos futuros, o desenvolvimento de protocolos para o estabelecimento da ora-pro-nóbis *in vitro* seria de suma importância. Especialmente, objetivando o controle de oxidação (com o uso de antioxidantes como polivinilpirrolidona, cisteína e/ou ácido ascórbico), de contaminação (tratamentos preventivos com fungicidas e bactericidas na planta matriz antes do estabelecimento *in vitro*) e formulação do meio de cultivo com as concentrações adequadas dos reguladores de crescimento.

#### Referências

- Aloufa, M. A. I. (2007). Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 13, 1994-1952.
- Ângulo-Bejarano, P. I., & Paredes-López, O. (2011). Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae*, 128(1), 283-288.
- Basra, A. S. (2000). *Plant Growth Regulators in Agriculture and horticulture: their role and commercial uses*. 262p.

- Botrel, N., Madeira, N. R., Mello, R. A. de C., & Amaro, G. B. (2017). Hortaliças não convencionais/hortaliças tradicionais – ora-pro-nóbis. *Folder Embrapa Hortaliças*.
- Castro, T. C. (2015). *Produção de plantas e metabólitos de Cleome dendroides Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) utilizando diferentes sistemas de cultivo in vitro*. [Tese de Doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro]. 228p.
- Chornobrov, O., & Bilous, S. (2021). *In vitro* plant regeneration of Christmas cactus ((Haw.) Moran) by indirect morphogenesis. *Folia Forestalia Polonica*, 63, 68–73.
- Cid, L. P. B., & Teixeira, J. B. (2010). *Cultivo in vitro de Plantas*. Embrapa Informação Tecnológica. 325p.
- Cordeiro, L. S., Simões-Gurgel, C., & Albarello, N. (2015). Multiplication and cryopreservation of adventitious roots of *Cleome rosea* Vahl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 51(3), 249-257.
- del Socorro Santos-Díaz, M., Elizalde-Rodríguez, C., & de Lourdes SantosDíaz, M. (2006). Effect of coconut water, darkness and auxins on morphogenesis of *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Cactaceae). *Bradleya* 2006, 83–88.
- Dill, L. (2014). *Estratégias de Micropropagação de Calibrachoa sellowiana (Sendtn.) Wijsman e Rosmarinus officinalis L.* [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina]. 37p.
- Flora do Brasil. (2020). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >.
- García-Rubio, O., & Malda-Barrera, G. (2010). Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *HortScience* 45, 934–938.
- García-Saucedo, P. A., Valdez-Morales, M., Valverde, M. E., Cruz-Hernandez, A., & Paredes-Lopez, O. (2005). Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 80, 215–219.
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., & Tucci, M. (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, 95, 319–332.
- Girão, L. V. C., Silva Filho, J. C., Pinto, E. B. P., & Bertolucci, S. K. V. (2003). Avaliação da Composição Bromatológica de ora-pro-nóbis. *Horticultura Brasileira*, 21(2), 1-4.
- Grattapaglia, D., & Machado, M. A. (1998). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. *Embrapa Serviço de Produção de Informação*, 1, 183-260.
- Guerra, M. P., Nodari, R. O., Fraga, H. P. F., Vieira, L. N., & Fritsche, Y. (2016). *FIT5507 Biotecnologia I (Apostila v2016.1)*. Universidade Federal de Santa Catarina. 44p.
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech.
- Ivannikov, R., Lobo, O., Ivannikova, N., & Krasnienkova, I. (2021). Micropropagation and organogenesis of *Astrophytum asterias* (Zuccà Lem. (Cactaceae Juss.), *Blossfeldia liliputiana* Werderm and *Strombocactus disciformis* (DC. Britton & Rose. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 11, e2201.
- Legnaioli, S. (2021). *O que são proteínas e quais suas funções*. <https://www.ecycle.com.br/7572-proteinas.html>.
- Madeira, R. N., Amaro, G. B., Melo, R. A. C., Botrel, N., & Rochinski, E. (2016). Cultivo de Ora-pro-nóbis (*Pereskia*) em Plantio Adensado sob Manejo de Colheitas Sucessivas. *Embrapa Circular Técnica: 156*, 20p.
- Malda, G., Backhaus, R. A., & Martín, C. (1999). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 1-9.
- Melo, N. F. (2002). Hormônios e Reguladores de Crescimento Vegetais. *Embrapa Semi-Árido: I Seminário Coda de Nutrição Vegetal*, 1-18.
- Mercier, H. (2012). Auxinas. In: Kerbauy, G. B. *Fisiologia Vegetal*. 173-196.
- Moraes, F. P., & Colla, L. M. (2006). Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2), 109-122.
- Moura, L. C., Titon, M., Fernandes, J. S. C., Santana, R. C., & Oliveira, M. L. R. (2012). Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(12), 1691-1698.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Papafotiou, M., Balotis, G. N., Louka, P. T., & Chronopoulos, J. (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 65, 163–167.
- Pereira, G. A. (2011). Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande Naine’ em diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial, 22-226.
- Poljuha, D., Balen, B., Bauer, A., Ljubešić, N., & Krsnik-Rasol, M. (2003). Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 75, 117–123.

- Rocha, L. V., Souza Júnior, J. B. de, Gonçalves, R. G. da M., Ferreira, J. B. N., Araújo, J. S. de P., & Miranda, R. M. (2020). Indução de enraizamento de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill) sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico. *Nature and Conservation*, 14(1), 101–106.
- Rodriguez, O. J. L., & Ramirez-Pantoja, P. E. (2020). Micropropagation of selected materials of *Opuntia ficus indica* L through culture *in vitro* of areola. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*. 7, 121–126.
- Santana, J. G. S., Fonseca, V. O., Costa, A. S., Arrigoni-Blank, M. F., & Blank, A. F. (2006). Influência de concentrações de BAP na micropropagação de manjerição (*Ocimum basilicum* L. - NSL6421-S2-05). *Horticultura Brasileira*. 24(1), 1-4.
- Santos, R. B., Paiva, R., Paiva, P. D. O., & Santana, J. R. F. (2001). Problemas no cultivo *in vitro*. In: *Cultura de Tecidos*. 73-79.
- Shukla, M. R., Jones, A. M. P., Sullivan, J. A., Liu, C., Gosling, S., & Saxena, P. K. (2012). *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): potencial role of auxin metabolismo in sustained plant proliferation. *Canadian Journal of Forest Research*, 42(4), 686-697.
- Silva, J. A. A., Nunes, D. G., Bertoldi, F. C., Palhano, M. N., & Komiekiewicz, N. L. K. (2010). Pão de ora-pro-nóbis: um novo conceito de alimentação funcional. *Agropecuária Catarinense*, Santa Catarina, 23(1), 35-37.
- Souza, L. S., Fior, C. S., Souza, P. V. D., & Schwarz, S. F. (2011). Desinfestação de Sementes e Multiplicação *in vitro* de Guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 691-697.
- Souza, M. R. de M. (2013). *Ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Mill.) como alternativa promissora para produção de proteína: densidade de plantio e adubação nitrogenada*. [Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa]. 87p.
- Tofanelli, M. B. D., & Resende, S. G. (2011). Sistemas de condução na produção de folhas de ora-pro-nóbis. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41(3), 466-469.
- Wakhlu, A., & Bhau, B. S. (2000). Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*. 36, 211–214.