

# Uso do antibiótico sulfato de estreptomicina no controle da contaminação *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*

## Use of antibiotic streptomycin sulphate to the control *in vitro* contamination of nodal segments of *Eugenia involucrata*

Charlene Moro Stefanel<sup>1</sup> , Lia Rejane Silveira Reiniger<sup>1\*</sup> , Caetano Miguel Lemos Serrote<sup>1</sup>   
e Ana Cristina da Fonseca Ziegler<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

**\*Autor para correspondência:**  
liarsr@ufsm.br

**Conflitos de Interesse:**  
Os autores declaram não ter conflito de interesse

**Licença:**  
Artigo publicado em acesso aberto sob uma licença Creative Commons CC-BY

**Contribuição do autor:**  
Todos os autores fizeram contribuições substanciais para a concepção e desenho deste estudo, para a análise e interpretação dos dados, revisão do manuscrito e aprovação da versão final. Todos os autores assumem responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito.

**Histórico:**  
Recebido: 11/07/2020;  
Aceito: 12/08/2021

**Período de publicação:**  
Janeiro-Junho de 2021

### RESUMO

A descontaminação dos explantes é requisito para a eficiência da micropropagação. O trabalho teve como objetivo avaliar o modo de utilização do antibiótico sulfato de estreptomicina (SE) no controle de bactérias endógenas em segmentos nodais micropropagados de *Eugenia involucrata*. Os tratamentos foram: T<sub>1</sub> (explantes sem contaminação prévia); T<sub>2</sub> (explantes com contaminação prévia); T<sub>3</sub> (explantes sem contaminação e imersos em solução de SE a 100 mg L<sup>-1</sup> durante 5 min); T<sub>4</sub> (explantes com contaminação e imersos em solução de SE a 100 mg L<sup>-1</sup> durante 5 min); T<sub>5</sub> (explantes sem contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de SE); e T<sub>6</sub> (explantes com contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de SE). Decorridos 30 dias de cultivo *in vitro* não houve efeito significativo sobre as variáveis sobrevivência (média de 94,44%) e contaminação fúngica (média 6,94%). As maiores contaminações bacterianas foram observadas em T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (100%), já em T<sub>5</sub> (16,67%) observou-se a menor média. Ocorreu maior número de folhas em T<sub>5</sub> (3,83), que diferiu estatisticamente de T<sub>2</sub> e T<sub>4</sub>, os quais apresentaram a menor média. A imersão não controla a proliferação de bactérias. A inoculação na ausência de contaminação prévia controla a proliferação, mas não reduz as bactérias quando há contaminação. O desenvolvimento das folhas é prejudicado pela presença de bactérias.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos, micropropagação, bactérias endógenas

### ABSTRACT

Decontamination of explants is a requirement for micropropagation efficiency. The aim of this work was to evaluate the use of the antibiotic streptomycin sulfate (SE) in the control of endogenous bacteria in micropropagated nodal segments of *Eugenia involucrata*. The treatments were: T<sub>1</sub> (explants without previous contamination); T<sub>2</sub> (explants with previous contamination); T<sub>3</sub> (explants without contamination and immersed in SE solution at 100 mg L<sup>-1</sup> for 5 min); T<sub>4</sub> (contaminated explants and immersed in SE solution at 100 mg L<sup>-1</sup> for 5 min); T<sub>5</sub> (explants without contamination and inoculated in a medium containing 100 mg L<sup>-1</sup> of SE); and T<sub>6</sub> (contaminated explants and inoculated in medium containing 100 mg L<sup>-1</sup> of SE). After 30 days of *in vitro* culture, there was no significant effect on the variables survival (mean 94.44%) and fungal contamination (mean 6.94%). The highest bacterial contamination was observed in T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> (100%), whereas in T<sub>5</sub> (16.67%) the lowest average was observed. In T<sub>5</sub> was observed the greatest number of leaves (mean 3.83), which differed statistically from T<sub>2</sub> and T<sub>4</sub>, which presented the lowest averages. Immersion does not control the bacteria proliferation whereas inoculation in the absence of prior contamination controls bacteria proliferation whereas inoculation with contaminated explants does not reduce it. Leaf development is hindered by the presence of bacteria.

**Keywords:** tissue culture, micropropagation, endogenous bacteria

## INTRODUÇÃO

*Eugenia involucrata* De Candolle é popularmente conhecida como Cerejeira, Cerejeira-do-mato, Cerejeira-da-terra, Cerejeira-do-rio-grande, dentre outros (Carvalho, 2008). Pertence à família Myrtaceae, a qual é uma das famílias botânicas mais conhecidas pelo potencial biotecnológico das espécies nativas (Camlofski, 2008). Essa espécie

ocorre naturalmente em vários países da América do Sul, como Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (Lorenzi, 2020). Possui frutos que são altamente consumidos tanto na alimentação humana como na alimentação animal. Além disso, há potencialidade de usos de sua madeira na construção civil, na produção de ferramentas agrícolas e na produção de lenha e carvão, e suas árvores podem integrar projetos de recuperação de áreas degradadas e serem utilizadas

no paisagismo e na arborização de áreas urbanas (Carvalho, 2008).

Diante do seu elevado potencial econômico, social e ambiental, justificam-se estudos relacionados à produção de mudas via propagação vegetativa, em particular a realizada por meio da cultura de tecidos, uma vez que a *Eugenia involucrata* possui sementes recalcitrantes, não suportando longos períodos de armazenamento (Carvalho, 2008), o que compromete sua propagação pela via seminal. Na cultura de tecidos, é essencial o controle da contaminação microbiana, pois o meio nutritivo proporciona um ambiente favorável para o crescimento de micro-organismos, como bactérias e fungos (Costa, Scherwinski-Pereira e Otoni, 2010), sendo uma das principais causas de perdas de material vegetal.

A contaminação microbiana pode ocorrer em razão de uma desinfestação ineficiente ou inadequada do material vegetal, dos materiais utilizados e/ou do meio de cultivo. Porém, quando o surgimento destes micro-organismos não decorre destes erros, essa contaminação é denominada de endógena (Esposito-Polesi, Abreu-Tarazi, Almeida, Tsai e Almeida, 2017).

Em *Eugenia involucrata*, particularmente, esse fato já foi evidenciado (Golle, Reiniger, Bellé e Curti, 2013; Gallon, 2017; Stefanel, Reiniger, Silva, Rabaiolli e Silva, 2020), sendo registrada uma alta contaminação *in vitro* por bactérias endógenas nas culturas dessa espécie. O mesmo foi observado no cultivo *in vitro* de *Eugenia uniflora* (Lattuada, 2010), *Eucalyptus benthamii* (Esposito-Polesi, Andrade, Almeida, Andreote e Almeida, 2015), *Psidium cattleianum* (Freire, Gardin, Baratto, Vieira e Werner, 2018) e *Campomanesia xanthocarpa* (Machado, Degenhardt, Maia e Quoirin, 2020).

As bactérias endógenas, introduzidas sistemicamente com os explantes, impõem consideráveis limitações na fase de estabelecimento *in vitro* de plantas (Palú, Côrrea, Suzuki e Boliani, 2011), ocasionando perda de tempo, de recursos financeiros e de material vegetal. Também, os agentes contaminantes podem competir com os explantes pelos nutrientes do meio de cultivo e liberar metabólitos tóxicos que podem ocasionar a morte das plantas (Pereira, Boliani e Furlani Júnior, 2014). Do ponto de vista prático, a melhor solução consiste em realizar a autoclavagem e o subsequente descarte do material contaminado. Entretanto, quando existir o interesse na manutenção de determinados clones, torna-se necessário efetuar o controle dessas bactérias com o uso de antibióticos específicos (Pereira, Boliani e Furlani Júnior, 2014), os quais são adicionados aos meios de cultivo. Todavia, a maioria das bactérias endógenas são resistentes a alguns antibióticos por algum motivo desconhecido (Ramakrishna, Yadav e Li, 2019).

Um dos antibióticos mais utilizados para o controle da contaminação bacteriana é o sulfato de estreptomicina. As estreptomicinas podem interferir na leitura correta do código genético, ocasionando a incorporação de aminoácidos diferentes, resultando, assim, em uma enzima inativa ou não-funcional (Kurylowicz, 1981). Apesar da utilização de antibióticos ser de grande importância para o controle de bactérias endógenas, alguns antibióticos utilizados podem possuir ação bacteriostática, e não bactericida, sendo fitotóxicos para plantas (Grattapaglia e Machado, 1990). Para se evitar problemas de toxicidade é necessário, portanto, testar a eficiência de seu modo de utilização, seja na imersão dos explantes em soluções contendo o(s) antibiótico(s), como na inoculação em meio nutritivo, além da pulverização das plantas matrizes usadas como doadoras de explantes (Pereira, Mattos e Fortes, 2003).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do modo de utilização do antibiótico sulfato de estreptomicina no controle *in vitro* de bactérias endógenas em brotações de *Eugenia involucrata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As brotações utilizadas para a realização do experimento, provieram de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, os quais foram previamente submetidos à desinfestação superficial durante 1 min em etanol a 70% (v/v), seguida da imersão durante 15 min em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% (v/v), e, após 15 min, em solução de hipoclorito de cálcio (CaClO) a 2,5% (p/v). Na sequência, os segmentos nodais foram enxaguados três vezes com água destilada estéril. Os segmentos nodais desinfestados foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com concentração de sais reduzida à metade ( $\frac{1}{2}$ MS), contendo 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 4 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 6,0, conforme metodologia de Stefanel (2016). O meio nutritivo, anteriormente à inoculação dos explantes, foi autoclavado a 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 min. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, as brotações originadas foram utilizadas para a realização do presente experimento.

Os tratamentos foram constituídos da adição ou não do antibiótico sulfato de estreptomicina puríssimo (tratado como SE no texto) ao meio nutritivo ou da imersão dos explantes em solução contendo o antibiótico. Utilizaram-se segmentos apicais

caulinares, com aproximadamente 1 cm de tamanho, que apresentavam ou não contaminação bacteriana prévia. Os tratamentos foram: T<sub>1</sub> (controle negativo) (explantes sem contaminação prévia); T<sub>2</sub> (controle negativo) (explantes com contaminação prévia); T<sub>3</sub> (explantes sem contaminação e imersos em solução de SE a 100 mg L<sup>-1</sup> durante 5 min); T<sub>4</sub> (explantes com contaminação e imersos em solução de SE a 100 mg L<sup>-1</sup> durante 5 min); T<sub>5</sub> (explantes sem contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de SE); e T<sub>6</sub> (explantes com contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de SE).

Conforme o tratamento, o antibiótico SE (esterilizado a frio) foi adicionado ao meio nutritivo após a autoclavagem do meio, quando foi atingida a temperatura ambiente, mas antes da sua solidificação. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo unifatorial, composto por seis tratamentos e dez repetições, contendo três explantes cada uma. A unidade experimental foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo MS com concentração de sais reduzida à metade (½MS). Os frascos de vidro utilizados foram autoclavados antes da adição dos meios. Ao meio nutritivo ½MS foram acrescentados 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à solidificação com ágar e, na sequência, o meio nutritivo e os frascos de vidro foram autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão durante 15 min.

Após a inoculação, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 °C ± 2, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* avaliaram-se as variáveis: sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante) (%), contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) (%), contaminação fúngica (presença de micélios fúngicos junto aos explantes) (%) e número de folhas por explante.

Após avaliar a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, as médias foram transformadas, pela função  $\sqrt{x+0,5}$ , sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (Ferreira, 2014). Para

determinar a precisão dos ensaios foi estimado o Índice de Variação (IV), calculado por  $\frac{CV}{\sqrt{N}}$ , em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (Pimentel-Gomes, 2009).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a sobrevivência (média geral de 94,44%) e contaminação fúngica (média geral de 6,94%), não houve efeito significativo dos tratamentos. Houve efeito significativo para as variáveis contaminação bacteriana (p= 0,0002) e número de folhas por explante (p= 0,0150) (Tabela 1).

Foi observada uma alta sobrevivência dos explantes, indicando que o antibiótico nas condições e concentração testada (100 mg L<sup>-1</sup>) não foi fitotóxico para as brotações de *Eugenia involucrata*. Também, não se observou a morte dos explantes cujas culturas apresentavam sinais de crescimento de colônias bacterianas no meio, sugerindo que as bactérias presentes são de natureza endógena e não fitopatogênicas. De maneira semelhante, no cultivo *in vitro* da Figueira (*Ficus carica*) houve aproximadamente 100% de sobrevivência dos explantes, indicando não haver efeito fitotóxico dos diferentes antibióticos testados e suas concentrações (Palú, Côrrea, Suzuki e Boliani, 2011). Também, no cultivo *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis*), breu branco (*Protium spruceanum*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), foram obtidos índices muito elevados de sobrevivência com a utilização do antibiótico ampicilina a 500 mg L<sup>-1</sup> (Brandão, 2011). Porém, no cultivo *in vitro* de Copaíba (*Copaifera multijuga*), não houve sobrevivência de nenhum explante quando submetidos aos tratamentos de desinfestação contendo os antibióticos ampicilina e cloranfenicol (isoladamente), ambos a 500 mg L<sup>-1</sup> (Brandão, 2011). Esses resultados distintos podem ser explicados pelo fato de que cada antibiótico gera um tipo de defesa, a qual depende da composição química e do modo como eles atuam sobre as bactérias (Santana, 2006), sendo recomendado, portanto, a realização de experimentos avaliando diferentes tipos de antibióticos para cada espécie, a fim de se obter a máxima eficiência de descontaminação e elevada sobrevivência dos explantes.

Houve uma média geral relativamente baixa para a contaminação fúngica (6,94%), provavelmente devido aos explantes serem provenientes de subcultivo livre de contaminantes fúngicos. A contaminação fúngica observada pode ter sido ocasionada na manipulação para a transferência dos explantes para o meio fresco e/ou, também, por contaminantes presentes no próprio meio nutritivo.

De maneira semelhante, em *Ficus carica*, a desinfestação superficial realizada nos explantes

**Tabela 1.** Contaminação bacteriana (%) e número de folhas por explante em brotações de *Eugenia involucrata* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), com a concentração de sais reduzida à metade (½MS), em função da imersão e/ou inoculação no sulfato de estreptomicina (SE). Santa Maria, Brasil, 2020.

Tratamentos	Contaminação bacteriana (%)	Número de folhas por explante
T <sub>1</sub>	33,33 a b*	2,00 a b*
T <sub>2</sub>	83,33 b c	0,67 b
T <sub>3</sub>	100,00 c	1,67 ab
T <sub>4</sub>	100,00 c	0,00 b
T <sub>5</sub>	16,67 a	3,83 a
T <sub>6</sub>	83,33 b c	1,67 ab
<b>Média</b>	<b>69,44</b>	<b>1,64</b>
<b>IV</b>	<b>4,41</b>	<b>18,21</b>

Em que: T<sub>1</sub> (explantes sem contaminação prévia); T<sub>2</sub> (explantes com contaminação prévia); T<sub>3</sub> (explantes sem contaminação e imersos em SE a 100 mg L<sup>-1</sup> durante 5 min); T<sub>4</sub> (explantes com contaminação e imersos em SE a 100 mg L<sup>-1</sup> durante 5 min); T<sub>5</sub> (explantes sem contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de SE); e T<sub>6</sub> (explantes com contaminação e inoculados em meio contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de SE).

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, em coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. (Índice de variação) =  $CV\sqrt{N}$ , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

anteriormente à inoculação, a qual continha, dentre outros agentes, fungicida (methiltiofan) e antibiótico (cloranfenicol), resultou na ausência de contaminação fúngica nos cultivos (Palú, Suzuki e Boliani, 2011). Contudo, em *Copaifera multijuga*, a utilização do fungicida derosal (5 mL L<sup>-1</sup>) associado aos antibióticos cloranfenicol (500 mg L<sup>-1</sup>) e ampicilina (500 mg L<sup>-1</sup>), ocasionou uma média de até 86% de explantes contaminados por fungos (Brandão, 2011). Apesar disso, há poucos relatos de trabalhos que confirmem o uso isolado de antibióticos para a redução da contaminação fúngica.

Para a variável contaminação bacteriana, o tratamento 1, o controle negativo de brotações que não estavam visivelmente com bactérias presentes, apresentou 33,33% de contaminação, enquanto que, no tratamento 2, o controle negativo de brotações que tinham contaminação bacteriana prévia, houve uma elevada contaminação (83,33%) (Tabela 1). No controle negativo com brotações que não apresentaram contaminação bacteriana prévia, e que foram apenas transferidas para o meio nutritivo fresco (tratamento 1), houve a proliferação desses micro-organismos. Uma significativa proliferação de bactérias no decorrer do cultivo tem sido frequentemente observada nos trabalhos realizados com essa espécie pelo nosso Grupo de Pesquisa, o que acaba comprometendo a continuidade dos experimentos. Isso também foi registrado no cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), em que a desinfestação superficial realizada foi eficiente no controle de bactérias na fase de estabelecimento, porém, após alguns subcultivos, foi observada a proliferação de bactérias endógenas (Santos e Wendling, 2010). No controle negativo com brotações que apresentaram contaminação bacteriana prévia, e que foram apenas transferidas para o meio nutritivo fresco (tratamento 2), houve uma elevada contaminação, muito provavelmente

decorrente da proliferação bacteriana previamente existente. Isso sugere que não devem ser utilizados, em experimentos ou fases de micropropagação subsequentes, os explantes já contaminados na fase de estabelecimento, pois esses micro-organismos podem ser bastante nocivos, os quais impõe consideráveis limitações para os cultivos (Pereira, Boliani e Furlani Júnior, 2014).

Nos tratamentos em que foram testadas a imersão de brotações sem e com contaminação bacteriana respectivamente (tratamento 3 e tratamento 4) (Tabela 1), observou-se, em ambos, uma contaminação de 100% dos explantes, indicando a ineficiência desse modo de utilização no controle de bactérias para a espécie. De maneira semelhante, em outro trabalho com *Eugenia involucrata*, Gallon (2017) obteve uma média elevada de contaminação submetendo os explantes à imersão em cloranfenicol (10 µL) indicando, também, a ineficiência deste método no controle das bactérias endógenas.

A imersão dos explantes em solução contendo antibióticos por um curto período de tempo, ao invés de sua adição ao meio nutritivo, é uma alternativa utilizada para evitar problemas com a fitotoxicidade, porém pode comprometer a eficiência no controle da contaminação bacteriana (Lima e Moraes, 2006), o que foi evidenciado no presente trabalho. O contrário, porém, foi observado no cultivo *in vitro* de *Aniba rosaeodora*, em que a menor porcentagem de contaminação bacteriana foi obtida pela imersão dos explantes durante 1 h em solução contendo 300 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina (Handa, Sampaio e Quisen, 2005); também, no cultivo *in vitro* de *Carapa guianensis*, cuja imersão dos explantes em solução contendo 500 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico ampicilina proporcionou as menores médias de contaminação (Brandão, 2011); e no cultivo *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora*), com a imersão dos explantes



em solução contendo 200 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico tetraciclina, cujo tratamento promoveu a ausência de contaminação bacteriana e fúngica (Lattuada, 2010). Deve-se destacar, ainda, que Gallon (2017) obteve baixa porcentagem de contaminação em *Eugenia involucrata* testando a imersão dos explantes de origem seminal em solução contendo nanopartículas de prata (AgNps). Entretanto, a utilização desta técnica deve ser limitada, devido, dentre outros, a preocupações em relação a segurança ambiental, visto que, a liberação excessiva de prata no meio ambiente pode ser prejudicial ao homem e à fauna (Hajipour et al., 2012), justificando, dessa forma, metodologias como a do presente estudo.

No tratamento em que as brotações sem contaminação bacteriana prévia foram inoculadas em meio nutritivo ½MS contendo 100 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico SE (tratamento 5), foi observada a menor média de contaminação (16,67%) do experimento. Esse resultado indica uma maior eficiência desse modo de utilização, que consiste na adição do SE ao meio nutritivo em que os explantes não previamente contaminados são cultivados, do que naquele em que é realizado seu contato por imersão no antibiótico, por 5 min, antes do cultivo. De maneira semelhante, no cultivo *in vitro* de bananeira (*Musa 'Grande Naine'*), a adição de 8 g L<sup>-1</sup> de agrimicina (cujos princípios ativos são o sulfato de estreptomicina e oxitetraciclina) ao meio MS, eliminou completamente a contaminação por bactérias nos explantes (Pereira, 2010). Também, no cultivo *in vitro* de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), a inoculação dos explantes em meio nutritivo contendo 500 mg L<sup>-1</sup> de amoxicilina, promoveu a ausência de contaminação bacteriana e fúngica, entretanto, apesar de ter sido eficiente para o controle desses micro-organismos, a presença do antibiótico no meio foi prejudicial ao desenvolvimento dos explantes, ocasionado, provavelmente, pela fitotoxicidade da amoxicilina (Santos, 2017).

Entretanto, na maioria dos experimentos, não é observada a eliminação total da contaminação *in vitro*, já que os tecidos vegetais podem servir como habitat para que esses micro-organismos se transloquem pelos seus tecidos (Pereira, Mattos e Fortes, 2003). Esse fato foi constatado no presente trabalho e, também, em acácia negra (*Acacia mearnsii*), em que a adição de 2 mL L<sup>-1</sup> do antibiótico kasumin no meio nutritivo ¾MS, resultou na proliferação de bactérias em 100% dos explantes (Ishibashi, Koguta, Flôres Júnior e Higa, 2017).

Apesar da menor contaminação evidenciada no tratamento 5, pode-se sugerir que o antibiótico SE teve um aparente efeito bacteriostático já que o mesmo tratamento em explantes previamente contaminados (tratamento 6) não obteve resultado satisfatório, como será discutido a seguir. O efeito bacteriostático observado é, somente, uma ação paliativa na

contaminação *in vitro*, frente ao objetivo principal de eliminação total desses micro-organismos (Pereira, Mattos e Fortes, 2003), portanto, recomenda-se a realização de novos experimentos com outros tipos de antibióticos e diferentes concentrações.

No tratamento em que se utilizaram brotações com contaminação prévia e cujo meio nutritivo continha SE (tratamento 6), foi observada uma média elevada de associação com bactérias. Esse resultado ratificou a observação de que não é adequada a utilização subsequente de explantes de *Eugenia involucrata* já contaminados e o possível efeito bacteriostático do antibiótico SE, relatado anteriormente.

Para a variável número de folhas observou-se que, no tratamento 5 (sem contaminação e com SE inoculado no meio), àquele de menor contaminação bacteriana (16,67%), os explantes formaram o maior número de folhas (3,83). Por outro lado, no tratamento 4 (com contaminação e imersão dos explantes em solução contendo SE), e em que 100% dos explantes foram contaminados após 30 dias de cultivo *in vitro*, não houve a formação de folhas, o que provavelmente foi ocasionado pela elevada contaminação bacteriana. Da mesma maneira, no cultivo *in vitro* de *Lippia alba*, os tratamentos que apresentaram menor contaminação formaram um maior número de folhas (Luz, Santos, Rodrigues, Blank e Asmar, 2014). No cultivo de *Myrciaria jaboticaba*, porém, o maior número de folhas em plântulas foi obtido quando não se utilizou antibiótico no meio nutritivo (Santos, 2017).

Em todos os tratamentos que apresentaram médias elevadas de contaminação bacteriana, a formação de folhas foi prejudicada, evidenciando, mais uma vez, a necessidade de descarte de explantes e/ou frascos contaminados, haja vista a ineficiência de controle por meio da imersão em SE, independentemente de haver ou não contaminação prévia dos explantes, e, também, por meio da inoculação no meio daqueles já contaminados. Além disso, a não formação de folhas ocasionada pela contaminação bacteriana nos cultivos de *Eugenia involucrata* é prejudicial à sua multiplicação *in vitro*, visto que, na inserção entre o caule e a folha pode existir a formação de novas gemas, que irão originar brotos e, conseqüentemente, uma nova planta (Costa, Nepomuceno e Santana, 2010).

## CONCLUSÕES

A adição do antibiótico sulfato de estreptomicina no meio nutritivo na ausência de contaminação prévia controla a proliferação das colônias bacterianas, mas não é eficiente em reduzi-las quando os explantes estão contaminados. A imersão dos explantes em solução com antibiótico não controla a proliferação de bactérias, tanto na presença quanto na ausência

de contaminação. O número de folhas é influenciado pela contaminação bacteriana dos explantes.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brandão, H. L.M. (2011). *Propagação in vitro de andiroba (Carapa guianensis Aublet), breu branco (Protium spruceanum Benth.), copaíba (Copaifera multijuga Hayne) e pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke)*. (Tese Doutorado em Biotecnologia). Manaus, Universidade Federal do Amazonas. 59 p.
- Camlofski, A. M. O. (2008). *Caracterização do Fruto de Cerejeira (Eugenia involucrata) visando seu aproveitamento tecnológico*. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Ponta Grossa, Universidade Estadual de Ponta Grossa. 102 p.
- Carvalho, P. E. (2008). *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília, Informação Tecnológicas, 593 p.
- Costa, M. G. C., Scherwinski-Pereira, J. E. & Otoni, W. C. (2010). Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: Scherwinski-Pereira, J. E. (Ed.). *Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 17-59.
- Costa, G. M., Nepomuceno, C. F. & Santana, J. R. F. (2010). Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, 40 (5), 1090-1096.
- Esposito-Polesi, N. P.; Andrade, P. A. M., Almeida, C.V., Andreote, F.D. &
- Almeida, M. (2015). Endophytic bacterial communities associated with to explante sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 33, 1737- 1746.
- Esposito-Polesi, N. P., de Abreu-Tarazi, M. F., de Almeida, C. V., Tsai, S. M. & de Almeida, M. (2017). Investigation of endophytic bacterial community in supposedly axenic cultures of pineapple and orchids with evidence on abundant intracellular bacteria. *Current microbiology*, 74 (1), 103-113.
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35 (6), 1039-1042.
- Freire, C. G., Gardin, J. P. P., Baratto, C. M., Vieira, R. L. & Werner, S. S. (2018)
- Micropropagation's complete protocol of red arçaça (*Psidium cattleianum*, Myrtaceae) from germinated seeds *in vitro*. *Journal Agricultural Science*, 10, 234-235.
- Gallon, F. I. (2017). *Desinfestação de segmentos nodais de Eugenia involucrata dc. através de nanopartículas de ouro e de prata visando à propagação in vitro*. (Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas). São Gabriel, Universidade Federal do Pampa. 60 p.
- Golle, D. P., Reiniger, L. R. S., Belle, R. A. & Curti, A. R. (2013). Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). *Cerne*, 19 (1), 77-82.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. (1990). Micropropagação. In: Torres, A. L. & Caldas, L. S. (Ed.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: ABCTP/Embrapa, 433 p.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J. & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30 (10), 499-511.
- Handa, L., Sampaio, P. T. B. & Quisen, R. C. (2005). Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica*, 35 (1), 29-33.
- Ishibashi, V., Koguta, K. V., Flôres Junior, P. C. & Higa, A. R. (2017). Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 13 (1), 15-20.
- Kurylowicz, W. (1981). *Antibióticos – uma revisão crítica*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 341p.
- Lattuada, D. S. (2010). *Micropropagação e miniestaquia de Pitangueira (Eugenia uniflora L.)*. (Dissertação Mestrado em Fitotecnia). Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 75 p.
- Lima, J. D. & Moraes, W. S. (2006). Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36 (3), 181-186.
- Lorenzi, H. (2020). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384 p.
- Luz, J. M. Q., Santos, V. A., Rodrigues, T. M., Blank, M. F. A. & Asmar, S. A. (2014). Estabelecimento *in vitro* e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16 (2), 444-449.
- Machado, J. S., Degenhardt, J., Maia, F. R. & Quoirin, M. (2020). Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Arvores*, 34, 791 – 799.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Palú, E. G., Córrea, L. S., Suzuki, A. N. & Boliani, A. C. (2011). Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33 (2), 587-592.

- Pereira, J. E. S., Mattos, M. L. T. & Fortes, G. R. L. (2003). Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38 (7), 827-834.
- Pereira, G. A. (2010). Controle de contaminantes em explantes de bananeira 'Grande Naine' na micropropagação *in vitro*. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, 4 (2), 35-39.
- Pereira, G. A., Boliani, A. C. & Furlani Junior, E. (2014). Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira 'Thap maeo'. *Revista Ceres*, 61 (3), 299-305.
- Pimentel-Gomes, F. (2009). *Curso de estatística experimental*. Piracicaba: FEALQ, 451 p.
- Ramakrishna, W., Yadav, R. & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18.
- Santana, V. C. (2006). O papel dos antibióticos na resistência bacteriana. *Revista Cesumar*, 11 (1), 129-138.
- Santos, D. C. & Wendling, I. (2010). Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate. *Revista de Biologia e Farmácia*, 4 (2), 34-42.
- Santos, S. K. (2017). Ação de antibiótico na germinação e microenxertia *in vitro* de *Myrciaria jaboticaba* (VELL.) BERG. (Trabalho de conclusão de curso em Agronomia). Areia, Universidade Federal da Paraíba. 52 p.
- Stefanel, C. M. (2016). *Aspectos da qualidade de sementes e do estabelecimento in vitro de Eugenia involucrata De Candolle*. (Dissertação Mestrado em Engenharia Florestal). Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 101 p.
- Stefanel, C. M., Reiniger, L. R. S., Silva, L. D. da, Rabaiolli, S. M. dos S. & Silva, K. B. (2020). Diodos emissores de luz (LEDS) no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 40 (e201901930), 1-5.