



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**DOUGLAS VALENTIM DE ALVARENGA**

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE DESINFESTAÇÃO PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE *PHILODENDRON* SPP.**

Prof.<sup>a</sup> Natane Amaral Miranda  
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ  
DEZEMBRO – 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**DOUGLAS VALENTIM DE ALVARENGA**

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE DESINFESTAÇÃO PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE *PHILODENDRON* SPP.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof.<sup>a</sup> Natane Amaral Miranda  
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ  
DEZEMBRO – 2023

**AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE DESINFESTAÇÃO PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE *PHILODENDRON* SPP.**

**DOUGLAS VALENTIM DE ALVARENGA**

APROVADA EM: 06/12/2023

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Natane Amaral Miranda – UFRRJ  
Orientadora

---

Prof. Dr. José Carlos Arthur Junior – UFRRJ  
Membro

---

Prof. Dr. Tiago Böer Breier – UFRRJ  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que desempenharam um papel fundamental na realização deste trabalho. Cada uma delas contribuiu de maneira única para o sucesso deste projeto, e sou imensamente grato por todo o apoio e inspiração que me proporcionaram.

Primeiramente, quero agradecer ao meu pai e à minha mãe, fontes inesgotáveis de amor, encorajamento e apoio incondicional. Suas palavras de estímulo e sabedoria foram a bússola que guiou meu caminho durante toda essa jornada acadêmica. Sem a base sólida que vocês proporcionaram, este trabalho não seria possível.

Agradeço também aos meus amigos, verdadeiros pilares que estiveram ao meu lado nos momentos de desafio e celebração. Talita, Roberto, Cadinho e Alex - suas amizades encheram os dias de alegria e tornaram as dificuldades mais leves. O compartilhamento de ideias e experiências enriqueceu meu aprendizado.

À minha tia Ormi, que, mesmo não estando mais entre nós, deixou uma marca indelével em minha vida. Sua presença amorosa e seu exemplo de determinação continuam a inspirar-me diariamente. Dedico este trabalho à sua memória, reconhecendo o impacto positivo que teve em minha formação.

Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Natane, cuja dedicação, conhecimento e orientação foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua paciência, incentivo e feedback foram fundamentais para aprimorar minha compreensão e a qualidade deste projeto. Por fim, agradeço à banca avaliadora por sua contribuição crítica e construtiva. A todos vocês, minha mais sincera gratidão. Este trabalho é um reflexo do apoio e influência positiva que recebi ao longo dessa jornada. Cada um de vocês é parte integrante deste sucesso, e levo comigo as lições e memórias que compartilhamos.

## RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar o tempo de contato e diferentes concentrações de solução de hipoclorito de sódio sobre agentes antimicrobianos na desinfestação de explantes de *Philodendron subhastatum*, *Philodendron hopkinsianum* e *Philodendron acutatum*. Para conduzir a pesquisa, foram realizados três experimentos distintos. No experimento 1 testou-se a exposição de explantes à solução de hipoclorito 0,75% por 5, 10, 15 e 20 minutos. No experimento 2 testou-se a imersão prévia em gentamicina e captafol antes da desinfestação com hipoclorito. Já no experimento 3 testou-se as concentrações de hipoclorito de sódio 0, 2,5, 3,0 e 3,5% na desinfestação de segmentos nodais e plântulas. No Experimento 1, ao expor explantes foliares de *Philodendron subhastatum* a solução de hipoclorito 0,75%, observou-se que uma exposição de 15 minutos resultou em 30% de contaminação, a mais baixa entre os tempos avaliados. Entretanto, mesmo sem contaminação bacteriana, houve crescimento fúngico nesse intervalo. No Experimento 2, que avaliou fungicida e antibiótico na submersão prévia de explantes, o tratamento com ambos os agentes apresentou percentuais mais baixos de contaminação (30%), quando comparados com tratamentos isolados com captafol (0,15 g L<sup>-1</sup>) ou gentamicina (0,3 g L<sup>-1</sup>) que exibiram índices mais elevadas (70%). No Experimento 3, a desinfestação de plântulas e segmentos nodais *Philodendron hopkinsianum* e *Philodendron acutatum* indicou que a concentração de 3,0% de hipoclorito de sódio apresentou efeito mitigador na contaminação fúngica, enquanto o tratamento com 3,5% reduziu a contaminação bacteriana. Esses resultados evidenciam a complexidade da relação entre concentrações e eficácia da substância desinfestante frente ao microrganismo alvo.

**Palavras-chave:** Araceae; Tempo de Exposição; Agentes Antimicrobianos; Contaminação Bacteriana e Fúngica.

## ABSTRACT

This study aims to evaluate the contact time and effectiveness of different concentrations of sodium hypochlorite solution and antimicrobial agents in decontaminating explants of *Philodendron subhastatum*, *Philodendron hopkinsianum*, and *Philodendron acutatum*. In experiment 1, explant exposure to 0.75% hypochlorite solution was tested for 5, 10, 15 and 20 minutes. In experiment 2, prior immersion in gentamicin and pintafof was tested before disinfestation with hypochlorite. In experiment 3, concentrations of sodium hypochlorite 0, 2.5, 3.0 and 3.5% were tested in the disinfestation of nodal segments and seedlings. In Experiment 1, when exposing leaf explants of *Philodendron subhastatum* to a 0.75% hypochlorite solution, it was observed that a 15-minute exposure resulted in 30% contamination, the lowest among the evaluated times. However, even without bacterial contamination, fungal growth occurred within this interval. In Experiment 2, which evaluated fungicide and/or antibiotic in the pre-washing of explants, treatment with both agents showed lower contamination rates (30%), compared to isolated treatments with captan (0.15 g L<sup>-1</sup>) or gentamicin (0.3 g L<sup>-1</sup>), which exhibited higher rates (70%). In Experiment 3, the decontamination of seedlings and nodal segments of *Philodendron hopkinsianum* and *Philodendron acutatum* indicated that a 3.0% concentration of sodium hypochlorite had a mitigating effect on fungal contamination, while treatment with 3.5% reduced bacterial contamination. These results highlight the complexity of the relationship between concentrations and the effectiveness of the disinfectant against the target microorganism.

**Keywords:** Araceae; exposure time; antimicrobial agents; bacterial and fungal contamination.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
2.1 O gênero <i>Philodendron</i>	2
2.2 Espécies escolhidas para estudo	3
2.3 Cultura de tecidos vegetais: definição e importância	4
2.4 Iniciando o cultivo <i>in vitro</i> de plantas	5
2.5 Protocolos de desinfestação na cultura <i>in vitro</i>	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	7
3.1 Local de realização dos experimentos e material vegetal	7
3.2 Experimento 1: Tempo de exposição à solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) para desinfestar explantes foliares de <i>Philodendron subhastatum</i>	7
3.3 Fungicida e antibiótico na desinfestação de explantes foliares de <i>Philodendron subhastatum</i>	8
3.4 Experimento 3: Pré-imersão e concentrações de hipoclorito de sódio na descontaminação de plântulas de <i>Philodendron acutatum</i> e segmentos nodais de <i>Philodendron hopkinsianum</i>	9
3.5 Coleta e análise de dados	11
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	11
4.1 Experimento 1: Tempo de exposição à solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) para desinfestar explantes foliares de <i>Philodendron subhastatum</i>	11
4.2 Experimento 2: Fungicida e antibiótico na desinfestação de explantes foliares de <i>Philodendron subhastatum</i>	13
4.3 Experimento 3: Pré-imersão e concentrações de hipoclorito de sódio na descontaminação de plântulas de <i>Philodendron acutatum</i> e segmentos nodais de <i>Philodendron hopkinsianum</i>	15
<b>5. CONCLUSÕES</b>	18
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	18

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta biotecnológica que permite a propagação, multiplicação e regeneração de plantas em ambiente controlado, bem como a expressão e a transformação de características genéticas desejadas (Long *et al.*, 2022). Essa abordagem possibilita avanços significativos em diferentes áreas, incluindo melhoramento genético, produção de compostos bioativos, conservação de germoplasma e estudos de fisiologia e de desenvolvimento vegetal (Taiz *et al.*, 2017).

Uma das principais vantagens dessa técnica é a capacidade de propagar células e tecidos de forma rápida e eficiente. Por isso é utilizada na produção de mudas clonais de espécies de interesse econômico, garantindo a uniformidade genética e melhorando a produtividade das plantações (Silva Neto, 2009). Além disso, algumas espécies têm dificuldades de propagação por meio de sementes ou estacas. A cultura de tecidos vegetais permite superar essas limitações, possibilitando a produção em larga escala de mudas dessas espécies (Sehgal *et al.*, 2020). Ademais, possibilita a regeneração de plantas inteiras a partir de pequenos fragmentos, o que é útil para a propagação de espécies raras ou em perigo de extinção, preservando a diversidade genética e auxiliando programas de conservação (Nahla *et al.*, 2017).

Essa abordagem tem sido amplamente aplicada em projetos de conservação de plantas raras no Brasil, contribuindo para a recuperação de populações em perigo e garantindo a sobrevivência dessas espécies em ambientes naturais ameaçados (Lima *et al.*, 2021). A família Araceae compreende diversas espécies utilizadas em ornamentação e paisagismo, várias delas destacando-se pela exuberância de suas folhas (Correia, 2007). No entanto, algumas dessas espécies enfrentam ameaças sérias de extinção devido à degradação de seus habitats naturais (IUCN, 2022). Dentre as várias espécies da família Araceae, destaca-se as do gênero *Philodendron*, que compreende algumas espécies herbáceas que enfrentam ameaças ambientais, sendo a aplicação da cultura de tecidos uma alternativa para garantir a sobrevivência e a diversidade genética dessas plantas.

No entanto, a introdução bem-sucedida de espécies de *Philodendron* na cultura de tecidos não está isenta de desafios, sendo a contaminação uma das principais preocupações. A contaminação pode ocorrer por micro-organismos indesejados, como fungos e bactérias, comprometendo a integridade e a qualidade dos explantes vegetais (Donini *et al.*, 2022). Este desafio torna-se ainda mais relevante quando consideramos a conservação de espécies ameaçadas, exigindo uma abordagem específica para otimizar os processos de desinfestação (Figueiredo, 2003).

Diante desse cenário, o presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes concentrações de solução de hipoclorito de sódio e de outros agentes antimicrobianos na descontaminação de explantes de espécies de *Philodendron subhatatum*, *Philodendron hopkinsianum* e *Philodendron acutatum*. A escolha dessas espécies visa contribuir para o avanço das práticas de cultura de tecidos em *Philodendron* e, por extensão, para o sucesso de projetos de propagação e conservação das plantas desse gênero.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Philodendron*

O gênero *Philodendron* pertence à família Araceae e é o segundo maior da família, com 482 espécies reconhecidas e distribuídas principalmente na América do Sul, mas também ocorrem na América Central, México e nas Antilhas (Boyce *et al.*, 2013). Entre as espécies encontradas no Brasil, algumas são notáveis por sua relevância ornamental e presença em ambientes naturais, enquanto outras são endêmicas de certas regiões específicas (Coelho, 2000). O gênero é de interesse botânico, ecológico e econômico, pois possui espécies ornamentais, medicinais e alimentícias (Folz, 2017). As espécies ornamentais são cultivadas em jardins, vasos e arranjos florais, pela beleza e variedade de suas folhas e inflorescências (Nascimento *et al.*, 2003). As espécies medicinais são usadas na medicina popular, para o tratamento de doenças como inflamações e infecções (Nainwal, 2019). As alimentícias são consumidas pelos povos indígenas, que aproveitam os frutos, as sementes, os rizomas e as folhas de algumas espécies, após processos de cozimento ou fermentação, para eliminar as substâncias tóxicas presentes nas plantas (Folz, 2017).

As espécies de *Philodendron* apresentam uma grande diversidade morfológica, variando em tamanho, forma e cor das folhas, caules e inflorescências (Temponi *et al.*, 2005). As folhas podem ser simples ou compostas, e podem apresentar uma variedade de formas, como ovais, lanceoladas ou cordiformes (Rodrigues *et al.*, 2020). Os caules podem ser eretos, trepadeiras ou rasteiros. As inflorescências são geralmente compostas por um espádice, que é um tipo de inflorescência em forma de espiga, e uma espata, que é uma folha modificada que protege o espádice (Coelho, 2000).

Segundo Silva (2013), a espata pode atrair polinizadores, como besouros, moscas e abelhas, com cores, odores e temperatura. As flores femininas ocupam a parte basal do espádice, e as flores masculinas ocupam a parte apical, podendo haver uma zona estéril entre elas. A polinização de *Philodendron* é geralmente entomófila, ou seja, realizada por insetos, que são atraídos pela espata e pelo espádice, que podem emitir calor, odor e néctar. Os insetos polinizadores variam de acordo com a espécie de *Philodendron*, mas geralmente são besouros da família Scarabaeidae, que se alimentam do pólen e do tecido do espádice (Coelho, 2000).

O processo de polinização envolve duas fases: a protoginia e a protandria (Souza *et al.*, 2014). A protoginia ocorre quando as flores femininas amadurecem antes das flores masculinas, e recebem o pólen trazido pelos insetos de outras inflorescências (Jesus Filho; Santos, 2019). A protandria ocorre quando as flores masculinas amadurecem depois das flores femininas, e liberam o pólen que é levado pelos insetos para outras inflorescências. Essa sincronia temporal evita a autofecundação e favorece a polinização cruzada (Assis, 2012).

Algumas espécies de *Philodendron* enfrentam desafios significativos em relação à propagação, o que se torna especialmente preocupante quando consideramos que 21 delas foram classificadas como ameaçadas de extinção pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2023). Essa situação crítica é atribuída, em grande parte, à destruição de seus habitats naturais e ao comércio ilegal (IUCN, 2023). A problemática do comércio ilegal de plantas se agrava quando consideramos casos específicos, como o de espécies notáveis, a exemplo do *Philodendron spiritu sancti*. Este *Philodendron*, em particular, tem sido alvo de interesse devido à sua beleza única e características distintivas.

A demanda por essa espécie específica, muitas vezes, resulta em exploração predatória em seus habitats naturais, contribuindo para a sua ameaça de extinção (Dolabela *et al.*, 2022). A dificuldade na propagação dessas espécies é agravada pelo fato de algumas apresentarem limitações quanto à produção de sementes (Rodríguez, 1987).

Estudos ecológicos têm destacado a estreita relação entre *Philodendron* e as florestas tropicais, onde muitas dessas espécies são nativas (Silva, 2013). Além de seu papel estético e ornamental, algumas espécies desempenham funções essenciais na dinâmica florestal. Cavalheiro *et al.* (2002) indicou que espécies de *Philodendron* auxiliam na ciclagem de nutrientes, na regeneração de áreas degradadas e na sustentação da biodiversidade local.

## 2.2. Espécies escolhidas para estudo

*Philodendron subhastatum*, espécie nativa da Colômbia e Equador, ocorre nas florestas úmidas tropicais e equatoriais (Cerón, 2003). É uma planta do tipo trepadeira, que cresce sob as copas das árvores, e possui folhas longas, bicolores, com a parte superior verde e a parte inferior vermelha. As folhas podem chegar a mais de 60 centímetros de comprimento, e possuem nervuras verdes escuras na parte de cima e avermelhadas por baixo (Royal Botanic Gardens, 2023). *Philodendron subhastatum* é uma planta extremamente ornamental, no entanto é tóxica, possui cristais de oxalato de cálcio, que podem causar irritação, dor, inchaço e dificuldade de respirar se ingeridos ou em contato com a pele ou os olhos (Oliveira *et al.*, 2017). Portanto, é uma planta que deve ser manuseada com cuidado, e que deve ser mantida longe do alcance de crianças e animais domésticos.

*Philodendron hopkinsianum* é uma espécie nativa do Brasil, onde ocorre nas florestas ombrófilas densas da Amazônia e da Mata Atlântica (Soares *et al.*, 2021). É uma planta do tipo hemiepífita, que se fixa nos troncos das árvores, e possui folhas pinatífidas ou bipinatífidas, com segmentos lanceolados e acuminados (Soares *et al.*, 2001.). É de difícil cultivo e requer condições ambientais específicas, como alta umidade, temperatura e luminosidade. Existem alguns estudos sobre o *Philodendron hopkinsianum*, mas não são muitos. A maioria das informações disponíveis são descrições taxonômicas e de distribuição

O *Philodendron acutatum*, originário da América do Sul, principalmente da Colômbia, Brasil e Guianas (JBRJ, 2023), é uma planta do tipo hemiepífita (GBIF, 2023), que cresce sobre as árvores, e possui folhas simples, elípticas, coriáceas e acuminadas. As folhas podem chegar a mais de 40 centímetros de comprimento, e possuem nervuras verdes claras. As inflorescências são do tipo espádice, com uma espata ovada, verde, e um eixo cilíndrico, com flores unissexuadas (Lóz, 2022).

Existem alguns estudos com *Philodendron acutatum*, sobre os seus usos e propriedades, sendo relatada como uma fonte de compostos fenólicos, flavonóides, taninos e saponinas, que podem ter atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais. Os estudos conduzidos por Gibka *et al.* (2009) representam uma contribuição significativa para a compreensão do potencial medicinal da espécie. A pesquisa revelou propriedades antioxidantes e antimicrobianas notáveis nos extratos da planta. A presença de compostos antioxidantes destaca a espécie como uma potencial fonte de agentes bioativos capazes de neutralizar radicais livres, contribuindo assim para a prevenção de danos celulares e envelhecimento precoce. Além disso, a detecção de propriedades antimicrobianas sugere

que os extratos da planta podem apresentar atividade contra micro-organismos patogênicos, promovendo possíveis aplicações no desenvolvimento de agentes antimicrobianos naturais.

### **2.3. Cultura de tecidos vegetais: definição e importância**

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica da biotecnologia que envolve o cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais em um meio de cultura adequado em condições assépticas e controladas (Hartmann *et al.*, 1963). Através desta técnica é possível propagar plantas de forma rápida e massiva a partir de um único explante, possibilitando a obtenção de clones geneticamente idênticos em grande escala (Galvão, 2019).

Um explante refere-se à porção de tecido vegetal retirada de uma planta, utilizada como ponto de partida para estabelecer um cultivo *in vitro* (Carvalho; Vidal, 2003). A origem do explante pode ter um impacto significativo nas respostas do cultivo de tecidos, uma vez que cada tipo de explante apresenta características únicas, como a presença de meristemas ou a diferenciação de células (Fernando, 2005). Essas características influenciam as respostas fisiológicas e os processos de regeneração, podendo resultar em variações nos índices de proliferação celular, na eficiência da formação de brotos e na capacidade de regeneração de plantas completas (Soares, 2009).

Esse potencial totipotente das células vegetais é fundamental para a regeneração de plantas inteiras a partir de partes fragmentadas, o que torna possível a multiplicação de plantas de interesse agrônomo, medicinal ou ornamental em larga escala (Taiz *et al.*, 2017). Segundo Andrade (2002), o conceito de totipotência refere-se à capacidade das células vegetais de se diferenciarem em todos os tipos de células do organismo e, posteriormente, formar um organismo completo. Essa característica das células vegetais é responsável pela plasticidade do desenvolvimento das plantas, permitindo respostas adaptativas a diferentes estímulos e condições ambientais. Dessa forma, a cultura de tecidos vegetais explora a capacidade de totipotência das células para a regeneração de plantas inteiras a partir de fragmentos de tecidos vegetais, como raízes, folhas ou meristemas (Carvalho; Vidal, 2003).

No Brasil, a cultura de tecidos vegetais teve início na década de 1960, com a implantação de laboratórios pioneiros em algumas universidades e institutos de pesquisa (Martins; Carvalho, 2012). Desde então, tem se desenvolvido e difundido pelo país, com a criação de diversos grupos de pesquisa dedicados à biotecnologia vegetal.

A importância da técnica é evidenciada em diversas áreas da ciência e da tecnologia. Na agricultura tem sido amplamente aplicada na multiplicação de plantas com características desejáveis, contribuindo para a produção em larga escala de mudas de alta qualidade genética e livre de doenças (Fluminhan; Fluminhan, 2012). Através dessa técnica, é possível analisar as respostas das plantas a diferentes estresses ambientais, como a salinidade e a seca, o que auxilia no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético visando à obtenção de plantas mais adaptadas às mudanças climáticas (Barroso *et al.*, 2003). Um exemplo de pesquisa nessa área foi conduzido por Nascimento (2021), que utilizou a cultura de tecidos de cana-de-açúcar para estudar a resposta da planta à exposição ao alumínio, um metal potencialmente tóxico presente em solos ácidos.

Outra aplicação reside na conservação de recursos genéticos vegetais, visando a preservação do germoplasma de valor econômico e de espécies ameaçadas de extinção (Bencke, 2008). O estudo conduzido por Veloso *et al.* (2012) explorou a cultura de tecidos de uma orquídea rara, a *Cattleya violacea*, ameaçada devido à sua coleta predatória na natureza.

Os resultados indicaram a eficácia do cultivo *in vitro* como estratégia para preservar essa espécie. Assim, seu emprego repercute de maneira expressiva na produção agrícola, na ampliação do conhecimento científico e na preservação.

Diante da dificuldade na propagação convencional de plantas em risco de extinção, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Philodendron*, obter material vegetal em quantidades suficientes para estudos e conservação torna-se um desafio significativo (Souza, 2014). A cultura de tecidos, nesse contexto, oferece uma solução viável e ética para superar as restrições enfrentadas na obtenção de material vegetal em grande escala. Ao possibilitar a propagação *in vitro* a partir de pequenos fragmentos, essa técnica não apenas contorna as limitações tradicionais de propagação, mas também contribui para a preservação da diversidade genética, essencial para a sobrevivência a longo prazo das espécies ameaçadas (Silva *et al.*, 2007).

Para além da aplicação direta em espécies ameaçadas, a cultura de tecidos em plantas do gênero *Philodendron* oferece uma abordagem estratégica e eficiente para a pesquisa e o desenvolvimento de protocolos de propagação (Sreekumar, 2001). Estudos prévios, como os conduzidos por Chen (2012), indicam que essa técnica pode ser aplicada com sucesso em diversas espécies do gênero, demonstrando sua eficácia na propagação e conservação dessas plantas. Dessa forma, espécies mais abundantes e acessíveis do mesmo gênero podem ser utilizadas como modelos para desenvolver e aprimorar técnicas que posteriormente serão aplicadas nas espécies ameaçadas do mesmo grupo.

#### **2.4. Iniciando o cultivo *in vitro* de plantas**

A cultura de tecidos vegetais envolve um processo cuidadoso e detalhado, dividido em etapas fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro*. Cada etapa é crucial para garantir a regeneração de plantas saudáveis e a obtenção de resultados confiáveis. A primeira etapa é o preparo dos explantes retirados da planta-mãe (Donini *et al.*, 2022). Para garantir a uniformidade genética e a manutenção das características desejadas, é essencial escolher uma planta matriz saudável (Vendruscolo *et al.*, 2012).

Na cultura *in vitro*, os tecidos vegetais podem exibir diferentes padrões morfogênicos, resultando em processos de desenvolvimento distintos. Dois dos principais padrões morfogênicos *in vitro* são a organogênese e a embriogênese somática (Flores *et al.*, 2007). Esses padrões morfogênicos *in vitro* também são influenciados por fatores genéticos, pela composição do meio de cultura e pelo tipo de explante (Taiz *et al.*, 2017). A organogênese refere-se ao processo de desenvolvimento de “órgãos” a partir de tecidos vegetais em cultura *in vitro*. Nesse processo, células ou explantes são induzidos a se diferenciarem e formarem estruturas distintas, como raízes, caules ou folhas (Schinor *et al.*, 2006). Por outro lado, a embriogênese somática envolve a formação de embriões a partir de células somáticas, que são células não reprodutivas. Esses embriões somáticos podem se desenvolver em plantas completas, permitindo a regeneração de plantas a partir de células individuais (Silveira *et al.*, 2007).

Logo, a escolha adequada do explante é essencial para o sucesso do cultivo, pois influencia diretamente a capacidade de regeneração das plantas (Oberschelp, 2014). Explantes como meristemas apicais, folhas jovens e segmentos caulinares são comumente utilizados devido à sua alta capacidade de proliferação celular e regeneração de plantas inteiras

(Carvalho; Vidal, 2003). Dentre os explantes amplamente explorados, estão os meristemas apicais, localizados nas extremidades dos caules e raízes. Esses tecidos especializados abrigam células indiferenciadas capazes de originar diferentes tipos celulares, logo facilitam a regeneração de plantas completas (Henrique et al., 2008). Paralelamente, segmentos nodais, constituídos por nós e partes adjacentes do caule, também são frequentemente empregados devido à presença de meristema nessas regiões (Fachinello, 2005).

As folhas também desempenham um papel significativo como explantes e oferecem uma abordagem distinta em comparação aos meristemas apicais. A seleção cuidadosa da maturidade e posição das folhas é crucial ao utilizar esse tipo de explante, uma vez que influencia diretamente a regeneração e a resposta ao meio de cultura (Andrade, 2002).

Após o preparo dos explantes, é necessário realizar a etapa de desinfestação e assepsia dos mesmos para eliminar quaisquer microrganismos contaminantes que possam afetar o desenvolvimento dos cultivos (Donini *et al.*, 2022). Segundo Lameira *et al.* (2000), a utilização de técnicas assépticas é fundamental para evitar a contaminação dos meios de cultura e garantir a pureza dos cultivos. A etapa de desinfestação dos explantes pode representar um grande gargalo no cultivo *in vitro* das espécies, uma vez que sem ela não há como iniciar o cultivo, e normalmente representa etapa de grandes perdas de material (Xavier; Wendling; Silva, 2021). Por isso a importância de ajustar um protocolo eficiente de desinfestação dos explantes, de forma que diminua a contaminação, mas também permita a introdução *in vitro* de material vigoroso para continuidade do processo propagativo.

E após a desinfestação, os explantes são transferidos um meio nutritivo contendo nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das células e tecidos vegetais. O mesmo pode ser sólido ou líquido e é complementado com uma variedade de nutrientes. Além disso, a formulação do meio de cultura pode ser ajustada de acordo com as necessidades específicas de cada espécie ou tipo de tecido (Caldas *et al.*, 1998).

## **2.5. Protocolos de desinfestação na cultura *in vitro***

A desinfestação adequada do material vegetal é uma etapa crucial na cultura *in vitro*, pois visa eliminar ou minimizar a contaminação microbiana e garantir um ambiente livre de patógenos indesejados (Yoshiko *et al.*, 2001). Para isso, são utilizados protocolos de desinfestação que incluem diferentes agentes químicos e técnicas específicas. Também, é importante ressaltar que a concentração do produto desinfestante e o tempo de imersão no tratamento de descontaminação dependem principalmente do tipo de tecido (Souza *et al.*, 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas é a imersão dos explantes em soluções desinfestantes, como hipoclorito de sódio (NaClO) ou álcool, seguida de lavagens em água destilada estéril para remover os resíduos químicos (Lameira *et al.*, 2000). O hipoclorito de sódio é um agente oxidante que atua na desinfestação de superfícies, enquanto o álcool possui ação bactericida e antisséptica (Cysne *et al.*, 2015; Venturelli *et al.*, 2009). Essa imersão é geralmente seguida por lavagens em água estéril para remover resíduos do agente desinfestante. Um estudo realizado por Donini *et al.* (2022) sobre a desinfestação superficial de explantes foliares de espécies de Araceae utilizou uma solução de hipoclorito de sódio,

seguida de três lavagens em água estéril. Esse protocolo mostrou-se eficiente na redução da contaminação microbiana, resultando em explantes livres de patógenos.

A adição de antibióticos e fungicidas ao meio de cultura é outra estratégia para evitar a contaminação (Carneiro *et al.*, 2000). A gentamicina é um antibiótico comumente utilizados para inibir o crescimento de bactérias (Leone, 2013). Enquanto o captafol é um fungicida eficaz contra alguns fungos fitopatogênicos (Duarte; Albuquerque, 1980). Já o Kasumin é um fungicida-bactericida com ação sistêmica, produzido a partir de processo de fermentação. Vidal *et al.* (2021) utilizaram o Kasumin para induzir brotações e assepsia de explantes de batata-doce, reduzindo a contaminação por fungos e bactérias. Além disso, a combinação de diferentes técnicas de desinfestação, como a imersão em solução de fungicida seguida de imersão em solução de antibiótico, tem sido empregada para garantir uma desinfestação mais eficiente (Pereira, 2022). Porém a execução da desinfestação com esses agentes químicos demanda cautela para evitar danos substanciais.

Segundo Donini *et al.* (2022), a desinfestação inadequada pode interferir nos processos morfogênicos ao causar danos celulares significativos que comprometem o material genético dos explantes. Logo, a escolha inadequada de concentrações de desinfestantes pode resultar em toxicidade química ao comprometer a viabilidade celular e a capacidade de regeneração (Fachinello, 2005). Agentes oxidantes, como o hipoclorito de sódio, podem induzir estresse oxidativo nas células, afetando estruturas celulares e prejudicando a integridade (Pereira et al., 2011). Bem como a exposição prolongada ou excessiva a desinfestantes pode levar à morte celular ou reduzir a viabilidade global dos explantes (Fachinello, 2005). Esse cenário impacta negativamente o sucesso da regeneração e desenvolvimento subsequente.

Portanto, a escolha do protocolo de desinfestação é crucial para obter um ambiente estéril e livre de contaminação microbiana na cultura de tecidos vegetais, e fornecer um explante estabelecido *in vitro* para continuidade das etapas de cultivo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local de realização dos experimentos e material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Recursos Genéticos Florestais (LABORGEN), vinculado ao Departamento de Silvicultura a ao Núcleo de Biotecnologia Florestal (NBF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, RJ.

As plantas matrizes utilizadas para fornecimento de explantes foram originárias de uma estufa caseira, cultivadas em substrato contendo casca de arroz carbonizada, perlita, torta de neem, casca de pinus e carvão, suplementada com adubação organomineral (Beiforth) a cada 15 dias. As plantas foram cultivadas sob fotoperíodo médio de 12 horas.

#### **3.2. Experimento 1: Tempo de exposição à solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) para desinfestar explantes foliares de *Philodendron subhastatum***

A espécie utilizada neste experimento foi o *Philodendron subhastatum* (Figura 1). Utilizou-se como explantes segmentos de folha, obtidos da segunda e terceira folhas mais jovens das plantas, as quais foram lavadas com água destilada de maneira corrente e realizados cortes retangulares de 6 x 8 cm, com auxílio de um bisturi, sobre uma bancada previamente higienizada. Os segmentos de folhas foram mantidos em um becker para posterior redução de tamanho e esterilização.

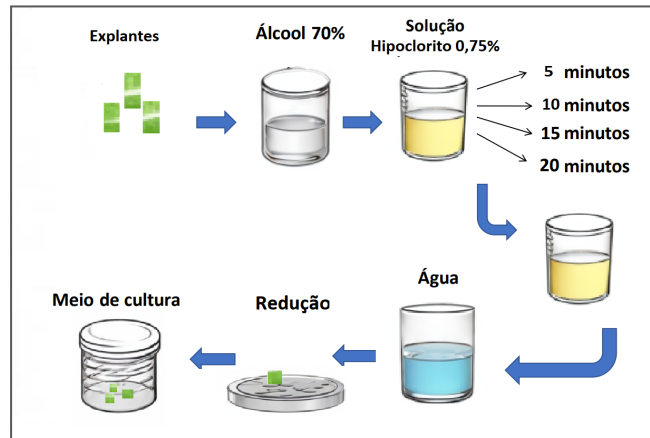
Em câmara de fluxo laminar, os segmentos de folha passaram por uma submersão inicial com solução de álcool 70% por 30 segundos. Em seguida, foram submetidos à solução de hipoclorito 0,75 % (v/v) por 5, 10, 15 e 20 minutos. Após cada período de contato com a solução de hipoclorito, realizaram-se três lavagens com água destilada autoclavada (Figura 2).

Os explantes foram, então, reduzidos para 1,0 cm<sup>2</sup> utilizando pinça e bisturi, e transferidos para frascos de vidro contendo meio de cultivo MS (Murashige; Skoog, 1962). O meio foi suplementado com 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,8 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7,0 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA) e 2,3 g L<sup>-1</sup> de phytagel. O pH final do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1.

Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento vegetal, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25°C e iluminação proveniente de luz LED branca. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (tempos de imersão em hipoclorito de sódio), dez repetições e três explantes por frasco de cultivo.



**Figura 1. a)** Espécime de *Philodendron subhastatum*; **b)** Explantes de *Philodendron subhastatum* tratados com hipoclorito de sódio inoculados em meio MS (fotos: autor).



**Figura 2.** Explantes de *Philodendron subhastatum* frente a diferentes tempos de contato com hipoclorito

### 3.3. Experimento 2: Fungicida e antibiótico na desinfestação de explantes foliares de *Philodendron subhastatum*

A espécie utilizada neste experimento foi o *Philodendron subhastatum*. Utilizou-se a mesma metodologia inicial do “Experimento 1”, até a redução de tamanho

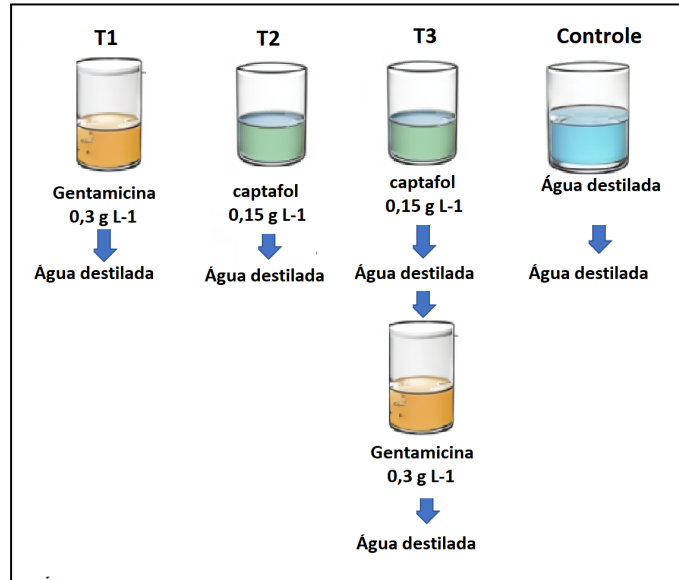
Em câmara de fluxo laminar, o Tratamento 1 consistiu na adoção de um procedimento complementar de imersão prévia por 10 minutos dos explantes em solução de antibiótico gentamicina  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ . O tratamento 2 consistiu na imersão em solução de fungicida captafol  $0,15 \text{ g L}^{-1}$ . Ambos os tratamentos foram seguidos por uma lavagem com água destilada autoclavada. O tratamento 3 consistiu na imersão dos explantes no fungicida por 10 minutos, seguido de lavagem com água destilada e uma nova imersão em solução do antibiótico por mais 10 minutos, finalizando com outra lavagem com água destilada estéril. O tratamento 4 foi considerado como controle, logo não foi utilizado fungicida e antibiótico (Figura 3).

Posteriormente, os explantes de todos os tratamentos passaram por uma exposição à solução de álcool 70% por 30 segundos. Em seguida, foram submetidos à solução de hipoclorito 1,5% (v/v) por 15 minutos. Após cada período de contato com a solução, realizaram-se três lavagens adicionais com água destilada autoclavada (Figura 4).

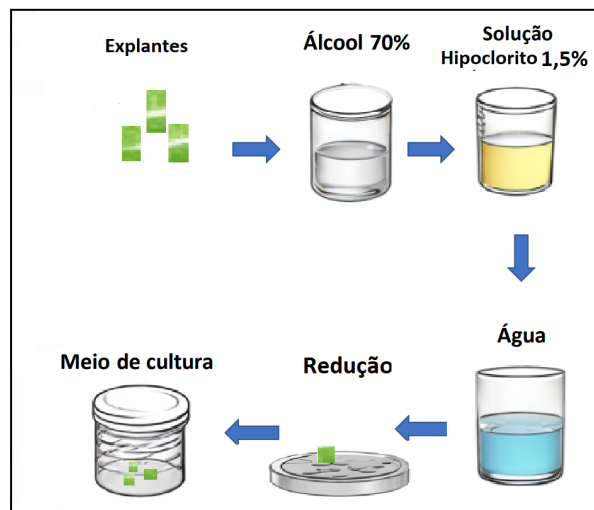
Em seguida os explantes foram reduzidos e inoculados em frascos de vidro contendo meio de cultivo MS, o qual foi suplementado com  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de mio-inositol,  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de PVP,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel. O pH final ajustado do meio foi de  $5,7 \pm 0,1$ .

Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 horas, sob luz LED branca, a uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (metodologias de desinfestação), cada um com dez repetições e três explantes por frasco de cultivo.





**Figura 3.** Desinfestação de explantes de *P. subhastantum* em diferentes soluções.



**Figura 4.** Desinfestação de explantes de *P. subhastantum* em solução de hipoclorito.

**Experimento 3: Pré-imersão e concentrações de hipoclorito de sódio na descontaminação de plântulas de *Philodendron acutatum* e segmentos nodais de *Philodendron hopkinsianum***

Neste experimento, plântulas de *Philodendron acutatum* (Figura 5a e 5b) e segmentos nodais de *Philodendron hopkinsianum* (Figura 5c e 5d) foram utilizados. Em câmara de fluxo laminar, os explantes passaram por uma submersão prévia com álcool 70% + kasumin (3 mL L<sup>-1</sup>). Posteriormente, os explantes foram imersos por 20 minutos em soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações 2,5%, 3,0% e 3,5%, adicionadas de 2 gotas de Tween 20 para 300 mL de solução. Em um dos tratamentos, apenas a pré-imersão foi realizada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação dos tratamentos de desinfestação utilizados nos explantes de *Philodendron acutatum* e *Philodendron hopkinsianum*, utilizando pré-imersão (PI) com Kasumin e desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

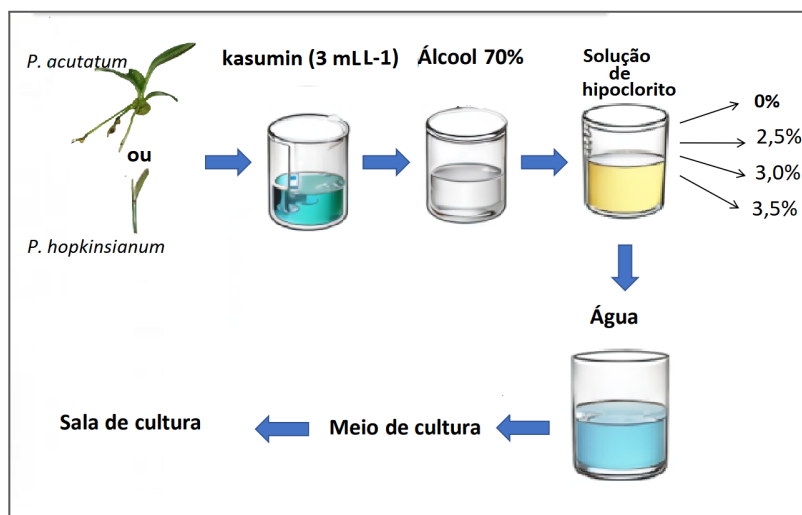
<b>Tratamento</b>	<b>Metodologia</b>
1	PL
2	PI+ 2,5% Hipoclorito
3	PI + 3,0% Hipoclorito
4	PI + 3,5% Hipoclorito

Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com água destilada e autoclavada em todos os tratamentos e finalmente os explantes foram inoculados (Figura 6) em Meio MS 50%, o qual foi suplementado com 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2,0 g L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH final ajustado do meio foi de 5,7 ± 0,1.

Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 horas, sob luz LED branca, a uma temperatura de 25 °C. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, sendo 2 tipos de explantes/espécie e 4 metodologias de desinfestação (Tabela 1). Cada tratamento é composto por dez repetições e com 1 explante por frasco de cultivo.



**Figura 5.** a) Plântula de *Philodendron acutatum*; b) Plântulas de *Philodendron acutatum* imersos em solução de hipoclorito; c) Espécime de *Philodendron hopkinsianum* d) Explante nodal de *Philodendron hopkinsianum* inoculado em meio MS. (Fotos: autor)



**Figura 6.** Desinfestação de Explantes de *P. acutatum* e *P. hopkinsianum*.

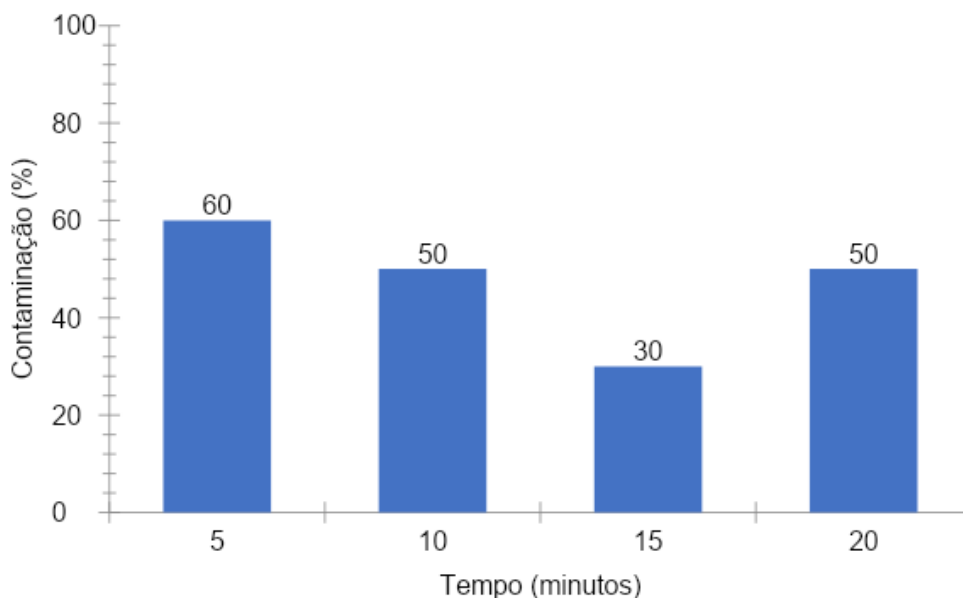
### 3.4. Coleta e análise de dados

As avaliações da contaminação dos explantes foram realizadas após 15 dias da montagem dos testes. Para o experimento 3, além do percentual de contaminação, foi avaliada a predominância do microrganismo presente no meio de cultivo (bactéria ou fungo). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando não atendidas às pressuposições, os dados foram transformados por arco seno da raiz da proporção. Os dados apresentados são os dados originais. Realizou-se teste de Tukey a 5% de significância com o auxílio do software R versão 4.2.3 (R Core Team, 2023), usando o pacote ExpDes (Ferreira *et al.*, 2014).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento 1 - Tempo de exposição à solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) para desinfestar explantes foliares de *Philodendron subhastatum*

Após análise de variância dos dados de contaminação, verificou-se que não houve diferença significativa ( $p = 0,6832$ ;  $CV = 83,22$ ) entre os tratamentos. O percentual médio de contaminação no teste foi de 47,5%, variando entre 30 e 60% (Figura 7).



**Figura 7.** Percentual de contaminação dos explantes foliares de *Philodendron subhastatum* submetidos a diferentes tempos de desinfestação de hipoclorito de sódio e inoculados *in vitro*

A etapa de desinfestação representa um desafio no cultivo *in vitro*, sendo importante obter material *in vitro* sem a presença de microrganismos. Apesar de não ser observada diferença significativa, a exposição do explante frente à solução de hipoclorito por 15 minutos resultou em 30% de contaminação, a menor entre todos os tempos avaliados, o que pode indicar informação relevante para futuros trabalhos com a espécie.

No intervalo de 5 minutos, a contaminação foi de 60%, o que pode indicar baixa eficácia na redução de organismos indesejados com a redução do tempo de exposição ao

hipoclorito de sódio. Foi observado também no experimento, nos tempos de 5, 10 e 20 minutos, presença de contaminação bacteriana e fúngica, mas no tempo de 15 minutos houve ausência de contaminação bacteriana, e apenas verificou-se crescimento fúngico.

De acordo com Monteiro *et al.* (2009), o hipoclorito, reconhecido por sua capacidade de eliminar microrganismos, incluindo bactérias e fungos, apresenta variações na eficácia, dependendo da concentração da solução e do tempo de exposição. Pesquisas, como o estudo de Vieira *et al.* (2021), corroboram a ideia de que o tempo de exposição do hipoclorito está diretamente relacionado à sua eficácia como desinfestante para explantes vegetais. Resultados indicam que períodos mais extensos de exposição podem resultar em uma redução mais significativa de microrganismos indesejados. Isso foi evidenciado no seu estudo com explantes de ápices caulinares da bananeira ‘Pacovan’ (*Musa spp.*), os quais apresentaram menor contaminação à medida que o tempo de imersão nas soluções desinfestantes aumentou.

Marchi *et al.* (2020), ao avaliarem o estabelecimento *in vitro* de sementes de *Adenium obesum* Roem. & Schult., concluíram que o tratamento mais eficaz foi aquele em que o explante permaneceu por mais tempo na solução de hipoclorito, resultando em 0% de contaminação com a utilização de 2,0% de hipoclorito por 20 minutos. Entretanto, as observações de Bianchi *et al.* (2003), ao examinarem o efeito do tempo de imersão de explantes de *Cydonia oblonga* Mill. em hipoclorito de sódio sobre a percentagem de contaminação total, indicam que existe um ponto em que essa eficácia pode atingir um platô ou mesmo resultar em efeitos adversos, manifestados pelo aumento na contaminação em tempos de exposição mais longos.

Rodrigues *et al.* (2007) ao analisarem as respostas de explantes de *Epidendrum ibacuense* frente a diferentes tempos de exposição ao hipoclorito de sódio constatou em alguns casos uma relação inversa entre o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e a contaminação, ou seja, em determinados casos, um tempo de exposição mais longo está associado a uma maior contaminação por fungos e bactérias. Essa observação é destacada na análise dos resultados, onde, em alguns experimentos, mesmo com tempos mais longos de exposição, não há uma redução proporcional na contaminação e, em alguns casos, a contaminação pode até aumentar. Essa constatação ressalta a complexidade da relação entre o tempo de exposição ao hipoclorito e o potencial desinfestante, sugerindo a necessidade de uma abordagem cautelosa na determinação do tempo de exposição para diferentes tipos de explantes vegetais.

#### **4.2. Experimento 2: Fungicida e antibiótico na desinfestação de explantes foliares de *Philodendron subhastatum***

A contaminação dos explantes foliares de *Philodendron subhastatum* foi influenciada pelos tratamentos de desinfestação utilizados ( $p = 0,1651$ ;  $CV = 57,66$ ). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, as médias de contaminação dos explantes variaram entre 20 e 70%. As percentagens mais baixas de contaminação foram observadas no tratamento em

que não houve imersão prévia com fungicida e/ou bactericida (20%), não sendo estatisticamente diferente do tratamento que fez uso do fungicida e bactericida concomitantemente (30%). Por outro lado, as percentagens mais elevadas de contaminação (70%) foram registradas nos tratamentos nos quais apenas o captafol ou apenas a gentamicina foram empregados isoladamente. Os dados coletados indicam que os diferentes tratamentos exerceram influência significativa na desinfestação, sendo que os tratamentos 1 e 2 foram inferiores ao tratamento 4.

**Tabela 2.** Valores médios de contaminação de explantes foliares de *Philodendron subhastatum* inoculados *in vitro* sob diferentes metodologias de desinfestação.

Tratamento	Metodologia	Contaminação %
1	Captafol	70 a
2	Gentamicina	70 a
3	Captafol + Gentamicina	30 ab
4	Controle	20 b

Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.

No tratamento 1, exclusivamente tratado com gentamicina, não foi observado crescimento bacteriano. Contudo, foi identificado o desenvolvimento de fungo filamentososo de micélio vegetativo na cor branca e micélio aéreo (conídios) na cor verde musgo (Figura 8a). Notou-se também a presença de gotículas alaranjadas sobre o micélio aéreo, o que sugere a produção de metabólitos pelo fungo. Com base nos aspectos morfológicos do crescimento fúngico (Cardoso *et al.*, 2007) é plausível que pertença ao gênero *Penicillium*, no entanto, para confirmação, é necessário o uso de técnicas de microscopia. Assim, é possível inferir que a gentamicina exerceu controle sobre o crescimento bacteriano, indicado pela possível ausência desses microrganismos no contexto do experimento, sugerindo a eficácia da gentamicina na inibição ou eliminação dos mesmos.

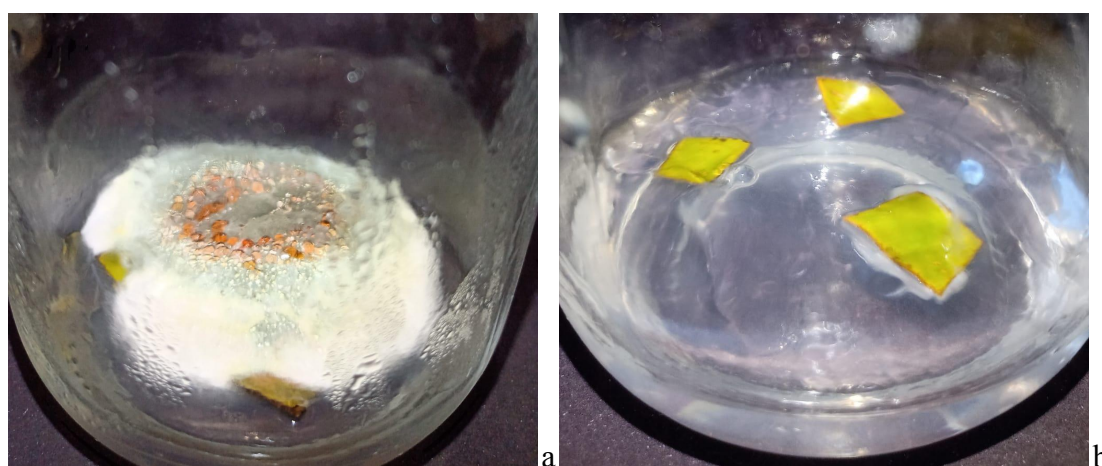
No estudo conduzido por Martín *et al.* (2007), foi isolada e identificada uma bactéria contaminante com alta frequência na população vegetal *in vitro* de Guádua (*Guadua angustifolia* Kunth) durante a fase de estabelecimento. Essa bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*, apresentou sensibilidade ao sulfato de gentamicina e a concentração inibitória mínima foi determinada a  $1\mu\text{g mL}^{-1}$ . Também, Capó *et al.* (2006) utilizaram sulfato de gentamicina para controlar a bactéria *Pantoea agglomerans* na micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.). Neste caso, a concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico foi de  $0,625\text{ mg L}^{-1}$ , enquanto a concentração bactericida mínima (CBM) foi de  $1,25\text{ mg L}^{-1}$  e resultou em um controle de 80% da contaminação bacteriana durante a fase de multiplicação.

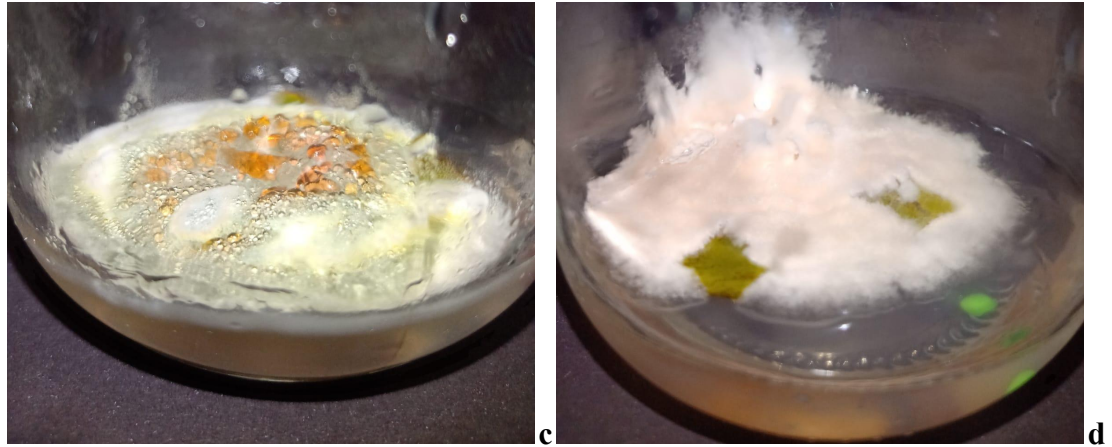
No tratamento 2, em que foi utilizado apenas o captafol, não foi observado crescimento fúngico. Entretanto, foi observado um crescimento discreto de bactérias ao redor

de alguns explantes (Figura 8b). Como no estudo de Rugge (1993), ao estabelecer Explantes multinodais de *Protea repens* cv. *Brasas* em cultivo *in vitro*, tratou anteriormente as plantas mãe com captafol (Difolatan, 1 g L<sup>-1</sup>) e iprodiona (Rovral flo, 1 mL.PI) o que reduziu a contaminação durante o estabelecimento para em até 14%. Também, Grover et al. (2007), ao inocular um isolado não esporulado de *Alternaria brassicae* em cultura de calos de *Brassica juncea* cv. Kranti, incorporaram captafol (100 mg L<sup>-1</sup>) ao meio de cultura de calos. Essa adição de captafol, demonstrou efetivo controle sobre a contaminação fúngica e inibição do crescimento de *A. brassicae*.

Já no tratamento 3, onde foi utilizado fungicida e antibiótico, foi possível observar predominante crescimento fúngico (Figura 8c) aparentemente semelhante ao observado no tratamento 1, além de possível crescimento bacteriano. Uma explicação plausível para a observação do predominante crescimento fúngico é que as lavagens realizadas posteriormente possam ter contribuído para a presença de fungos, considerando com o captafol é um fungicida de contato e que os seus resíduos foram possivelmente retirados por lavagens posteriores. Entretanto a combinação de determinados fungicidas e antibióticos possuem uma boa ação desinfestante. Como relatadas no estudo de Pereira (2019), onde ao estabelecer explantes *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King) utilizou combinações de fungicidas e antibióticos na desinfestação onde foram reduzidos a contaminação de 60% no tratamento controle para 20% no tratamento com os agentes desinfestantes combinados. Já Schiavinato *et al.* (2008) destacam o uso de duas soluções durante o estabelecimento de espádice de *Anthurium plowmanii*, uma solução antibiótica à base de nistatina e outra à base de Thiram (um fungicida).

Quando comparado com os outros tratamentos, o controle (T4) apresentou contaminação fúngica e bacteriana (Figura 8d), sendo o fungo diferente daquele observado nos tratamentos 1 e 3.





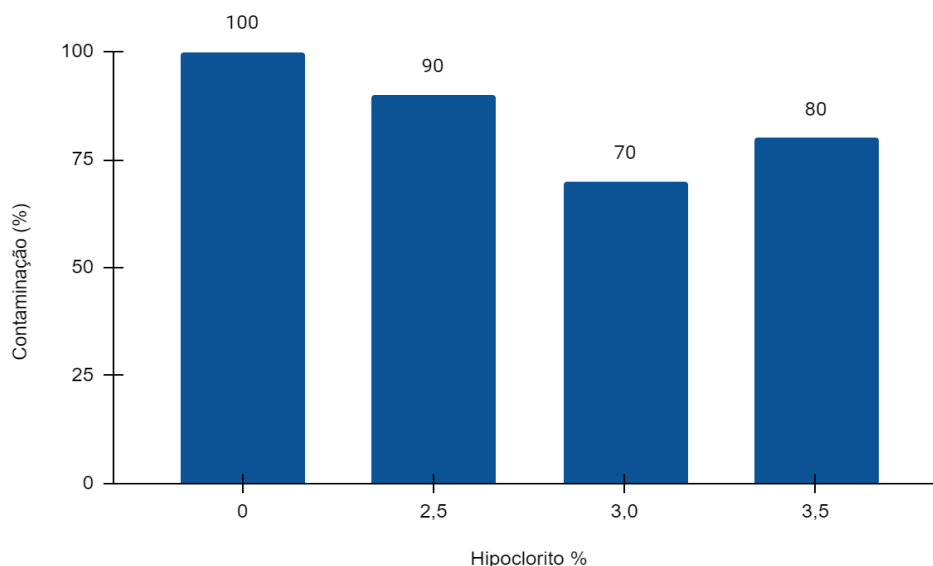
**Figura 8. a)** Crescimento de fungo filamentoso de micélio vegetativo na cor branca e micélio aéreo (conídios) na cor verde musgo em explantes de *Philodendron subhastatum* tratados com gentamicina  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ; **b)** Crescimento bacteriano ao redor de explantes de *Philodendron subhastatum* tratados com captafol  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  e inoculados em meio MS; **c)** Fungo filamentoso em explantes de *Philodendron subhastatum* tratados com captafol  $0,15 \text{ g L}^{-1}$  e gentamicina  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  ; **d)** Contaminação fúngica no tratamento controle.

#### 4.3. Experimento 3: Pré-imersão e concentrações de hipoclorito de sódio na descontaminação de plântulas de *Philodendron acutatum* e segmentos nodais de *Philodendron hopkinsianum*

Após 15 dias, realizou-se a avaliação da contaminação nos tratamentos aplicados na desinfestação de plântulas de *Philodendron acutatum* e segmentos nodais de *Philodendron hopkinsonianum*. Os resultados apontaram que não houve diferença significativa no percentual total de contaminação para os diferentes tratamentos de desinfestação testados, também não havendo influência do fator espécie/explante ( $p > 0,05$ ). No entanto, as diferentes metodologias de desinfestação influenciaram significativamente na prevalência de microrganismos que contaminaram os explantes *in vitro* ( $p < 0,05$ ; CV= 49,13).

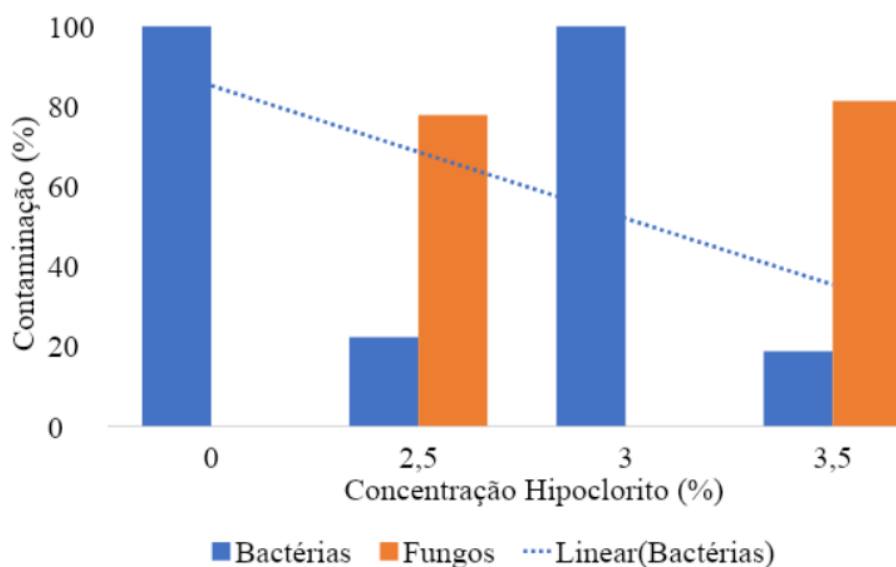
A contaminação total no experimento, quando considerado o fator espécie/tipos de explantes, foi de 85% em ambas situações. Quando se avaliou as concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas, as porcentagens foram de 100, 90, 70 e 80% para as concentrações 0, 2,5, 3 e 3,5%, respectivamente (Figura 9).





**Figura 9.** Taxa de contaminação dos explantes de *Philodendron* submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Ao avaliar os materiais contaminados e a predominância do microrganismo contaminante, observou-se que o fator espécie/tipos de explantes não foi significativo, com média de contaminação bacteriana de 61 e 58% e de contaminação fúngica de 39 e 42% para as plântulas de *Philodendron acutatum* e para os segmentos nodais de *Philodendron hopkinsonianum*, respectivamente. Para o fator concentração de hipoclorito, observou-se uma tendência de redução da incidência de bactéria com o aumento da concentração de hipoclorito, assim como observou-se aumento da predominância de fungos quando a concentração de hipoclorito aumenta (Figura 10).



**Figura 10.** Contaminação de explantes de *Philodendron acutatum* e *Philodendron hopkinsonianum in vitro* submetidos a diferentes metodologias de desinfestação após 15 dias.

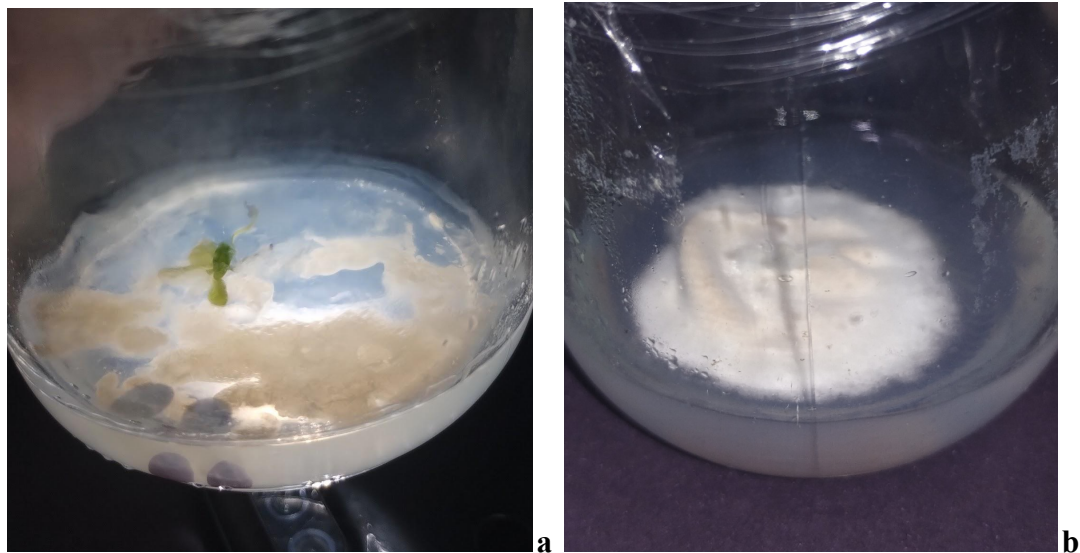
A utilização de 0 e 3% de hipoclorito proporcionou uma porcentagem de contaminação bacteriana (Figura 11a) significativamente elevada, atingindo 100%, enquanto a contaminação fúngica foi ausente. O uso de hipoclorito 2,5 e 3,5% mostrou uma redução da contaminação bacteriana, enquanto a contaminação fúngica foi relativamente alta (Figura 11b). Esses resultados indicam que o hipoclorito de sódio influenciou de maneira distinta os percentuais de contaminação bacteriana e fúngica em ambos os tipos de *Philodendron*.

O sucesso de desinfestação de explantes utilizando hipoclorito de sódio é dependente de variados fatores, como a concentração utilizada, o tempo de exposição, o material a ser desinfestado e o microrganismo alvo. Há relatos de aumento de contaminação bacteriana com aumento de concentração de hipoclorito, que pode estar relacionada ao aumento da concentração de cloro ativo, que resulta no aumento do pH da solução desinfestante. Conforme indicado por Hirata e Mancini Filho (2002), a faixa ideal de pH para a solução de hipoclorito de sódio, a ser utilizada como desinfestante, situa-se entre 5 e 8. Isso ocorre porque o aumento do pH favorece o desenvolvimento de mecanismos de defesa das bactérias, permitindo que prosperem mesmo em concentrações elevadas de cloro ativo, o que, por sua vez, dificulta a eficácia do produto.

Os resultados observados, particularmente em relação à concentração de 3% de hipoclorito de sódio, que apresentou uma contaminação bacteriana superior à concentração de 2,5%, bem como a presença de uma contaminação fúngica nas concentrações de 2,5% e 3,5% acrescenta uma camada adicional de complexidade ao cenário. A dinâmica intrincada entre fungos e bactérias, influenciada por múltiplos fatores, é evidenciada neste contexto. Essa diferenciação nas respostas bacteriana e fúngica às concentrações de hipoclorito reforça a necessidade de estudos específicos para compreender as características individuais de cada microrganismo em condições simuladas de cultivo *in vitro*. A literatura científica destaca que bactérias e fungos podem apresentar diferentes níveis de resistência e resposta a desinfestantes, incluindo o hipoclorito de sódio (Rescarolli *et al.*, 2009).

Esses resultados destacam a necessidade de realizar investigações minuciosas e específicas para cada contexto, levando em consideração as interações complexas entre os diferentes microrganismos envolvidos. Isso pode envolver a análise de adaptações bacterianas, o impacto nos mecanismos de defesa vegetal e a avaliação detalhada da eficácia do desinfestante em diferentes cenários. Logo, estudos adicionais são essenciais para elucidar os mecanismos subjacentes a essas observações a fim de aprimorar os protocolos.

Existem vários compostos que podem ser utilizados na desinfestação de materiais vegetais para estabelecimento do cultivo *in vitro*, sendo de grande importância os testes para ajuste de protocolos. A desinfestação representa a primeira etapa e também uma das mais complexas da propagação *in vitro*, muitas vezes impossibilitando a continuidade do cultivo da planta. No presente estudo, foi possível a obtenção de explantes livres de microrganismos *in vitro*, obtendo sucesso na primeira etapa para a micropropagação das espécies de *Philodendron*.



**Figura 11.** a) Crescimento bacteriano em plântulas de *Philodendron acutatum* tratados hipoclorito de sódio 3,5%; b) Crescimento de fungos ao redor de explantes nodais de *Philodendron hopkinsonianum* tratados hipoclorito de sódio 3,0% e inoculados em meio MS.

## 5. CONCLUSÕES

A desinfestação de segmentos foliares de *Philodendron subhastatum* em hipoclorito de sódio na concentração de 0,75% pode ser realizada utilizando tempos entre 5 e 20 minutos, obtendo uma média de contaminação de 48%.

Para desinfestação de explantes foliares de *Philodendron subhastatum* a imersão prévia com bactericida e/ou fungicida (gentamicina e captafol nas concentrações 0,3 e 0,15 g L<sup>-1</sup> respectivamente) é dispensável para diminuição da contaminação. No entanto, quando utilizada é indicado que a imersão em solução de fungicida e bactericida seja feita simultaneamente, resultando em porcentagens mais baixas de contaminação do que quando utilizadas individualmente.

A desinfestação em plântulas de *Philodendron acutatum* e segmentos nodais de *Philodendron hopkinsonianum* em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio impacta significativamente a composição microbiana *in vitro*. O uso de 3,0% de hipoclorito mostrou efeito mitigador na contaminação fúngica em ambas as espécies, enquanto o uso de 3,5% reduziu a contaminação bacteriana.

Os testes realizados permitiram a obtenção de plantas de *Philodendron* livres de contaminação *in vitro*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, 2002.

ASSIS, T. F. Evolução e estado da arte dos cruzamentos controlados em Eucalyptus. **Série técnica ipef**, v. 16, n. 37, p. 13, 2012.

- BARROSO, P. A. V. et al. Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, p. 473-477, 2003.
- BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea Gaudich.*(Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. Pesquisas, **Botânica**, v. 59, p. 299-306, 2008.
- BIANCHI, V. J. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 2, 2003.
- BOYCE, P. C.; CROAT, T. B. **The Uberlist of Araceae**: Totals for Published and Estimated Number of Species in Aroid Genera. Disponível em: <http://www.aroid.org/genera/130307uberlist.pdf>. Acesso em: 18 de out. de 2023.
- CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: B-CNPH, p. 261 – 296, 1998.
- CAPÓ, Y. A. et al. Empleo de Sulfato de gentamicina para el control de *Pantoea agglomerans*, contaminante de la multiplicación *in vitro* de *Solanum tuberosum* L cv. Desirée. **Biotecnología Vegetal**, v. 6, n. 4, 2006.
- CARDOSO, P. G. *et al.* Diferenciação morfológica e molecular de fungos produtores de pectinases *Penicillium expansum* e *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 71-77, 2007.
- CARNEIRO, F. S. *et al.* Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 294-303, 2014.
- CARNEIRO, M. F, *et al.* Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (Musa AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n. 1, 2000.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. 2003.
- CAVALHEIRO, A. L.; TOREZAN, J. MD; FADELLI, L. **Recuperação de áreas degradadas**: procurando por diversidade e funcionamento dos ecossistemas. A bacia do rio Tibagi. Londrina, Paraná, Brazil, p. 213-224, 2002.
- CERÓN, C. Etnobotánica de las fibras naturales del Ecuador. **Cinchonia**, v. 4, n. 1, p. 21-34, 2003.
- CHEN, F-C; WANG, C. Y.; FANG, J. Y. Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration. **Scientia horticultrae**, v. 141, p. 23-29, 2012.
- COELHO, M. A. N. *Philodendron Schott* (Araceae): morfologia e taxonomia das espécies da Reserva Ecológica de Macaé de Cima-Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 51, p. 21-68, 2000.
- COELHO, M. A. N. *et al.* 2015. Araceae *In* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

- CORREIA, S. M. **Caracterização genética de Araceae, com ênfase em espécies da Amazônia brasileira**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.
- CYSNE, A. Q.; SOUZA, M. G.; LIMA, W. A. A. Fungos associados a sementes híbridas interespecíficas de dendê em função da assepsia e do beneficiamento. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 58, n. 4, p. 372-378, 2015.
- DOLABELA, M. F. *et al.* Uma revisão bibliográfica sobre Araceae com foco nos gêneros Pistia, Philodendron e Montrichardia: aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 8, n. 2, p. 79-93, 2015.
- DONINI, L. P. *et al.* Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 517-522, 2022.
- DUARTE, M.; ALBUQUERQUE, F. C. Eficiência de diferentes fungicidas no tratamento de estacas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) infectadas por *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. Piperis). 1980.
- FACHINELLO, J. C. *et al.* Propagação de plantas frutíferas. Brasília: **EMBRAPA informação tecnológica**, 2005.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: An R package for ANOVA and experimental designs. **Appl. Math.** v. 5, n. 19, p. 2952–2958, 2014.
- FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- FIGUEIREDO, M. L. **Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de Bromeliaceae nativas do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- FLORES, R. *et al.* Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 993-995, 2007.
- FLUMINHAN, A; FLUMINHAN, T. V. A biotecnologia na produção em larga escala de mudas de cana-de-açúcar e a importância da automação dos processos. *In*: Zacharias, A. A.; Piroli, E. L.; Dias, L. S. (Eds.), **Cana-de-açúcar, expansão, métodos, tecnologias e impactos**. Editora ANAP, Tupã, BR, pp. 113–128. 2020.
- FOLZ, J. **A evolução das flores pistiladas no gênero Philodendron, Araceae, clado das Monocotiledôneas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.
- GALVÃO, J. S. V. V. **Propagação *in vitro* dos porta-enxertos de amendoeira (GF677), de pistaceira (UCB-1) e de aveleira (Dundee)**. Dissertação (mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas), Universidade do Minho, 2019.
- GIBKA, J.; KUNICKA-STYCYŃSKA, A.; GLIŃSKI, M. Experimental immunology Antimicrobial activity of undecan-3-one, undecan-3-ol and undec-3-yl acetate. **Central European Journal of Immunology**, v. 34, n. 3, p. 154-157, 2009.

- GROVER, A. *et al.* Induction of defense genes in *Brassica juncea* against *Alternaria brassicae*. In: **The 12 th international rapeseed congress**. 2007. p. 226.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. Plant propagation: principles and practice. **Soil Science**, v. 95, n. 1, p. 89, 1963.
- HIRATA, M. H.; MANCINI FILHO, J. **Manual de biossegurança Barueri: Ed. Manole**, 496p. 2002.
- JBRJ - **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Jabot - Banco de Dados da Flora Brasileira, 2023.
- JESUS FILHO, J. R.; SANTOS, V. da S. Autofecundação em mandioca. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. 2019.
- LAMEIRA, O. A. *et al.* **Cultura de tecidos: (manual)**. 2000.
- LEONE, G. F. Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2013.
- LIMA, A. P. P. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. *In vitro* culture of sempre-vivas species (Comanthera): a review. **Rodriguésia**, v. 72, 2021. 2021.
- LONG, Y.; YANG, Y.; PAN, G.; SHEN, Y. New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.
- LÓZ, S. C. S. **Flora do Rio Grande do Norte: Araceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Agrícola de Jundiá, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.
- MARCHI, Y. R. R.; FERNANDES, D. A. **Doses de hipoclorito e tempos de contato no estabelecimento in vitro de sementes de rosa do deserto (*Adenium obesum* Roem. & Schult.(Forssk.))**. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia), 2020.
- MARTÍN, C. M. *et al.* Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. **Bioteología vegetal**, v. 7, n. 1, 2007.
- MARTINS, C. R.; CARVALHO, A. C. P. P. Avanços da Cultura de Tecidos na Micropropagação de Plantas. **Ciclo de palestras sobre cultivo in vitro de plantas**, p. 28, 2012.
- MICHELUZZI, F. C. *et al.* Estudo da organogênese *in vitro* de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh.) Cv. **Galaxy**. 2007.
- MONTEIRO, J. A. S. *et al.* **Estabelecimento in vitro de segmentos apicais e formação de plântulas de *Libidibia ferrea* (UL.) LP Queiroz**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.2019.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497,1962.
- NAHLA, A., EL-SHERIF. **Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability**. 2017.

NAINWAL, P. Review on Philodendron Species-Plant Seeking for Validation of Its Therapeutic Approaches. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 5, p. 2003-2006, 2019.

NASCIMENTO, L., et al. "Avaliação *in vitro* de acessos de Saccharum à tolerância ao alumínio." (2021). **Seminário de iniciação científica e pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 10., 2021, Aracaju. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2021.

NASCIMENTO, T. M.; GRAZIANO, T. T.; LOPES, C.S. Espécies e cultivares de sanseviéria como plantas ornamentais. **Ornamental Horticulture**, v. 9, n. 2, 2003.

OBERSCHELP, G. P. J. **Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden**: desenvolvimento de um novo meio basal e estimação de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2014.

OLIVEIRA, R. R.; PASIN, L. A. A. P. Ocorrência de oxalato de cálcio em diferentes espécies vegetais de uso ornamental. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 3, p. 41-52, 2017.

PEREIRA, J. P. **Desinfestação de sementes e caracterização molecular de estirpes de *Azospirillum* spp. coinoculadas com fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de *Urochloa brizantha* cv. marandu**. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias), Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, 2022.

PEREIRA, W. P. **Estabelecimento *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King em cultura de tecidos vegetais**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2019.

PEREIRA, G.A. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira'Grande naine'em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 222-226, 2011.

GBIF Backbone Taxonomy. ***Philodendron acutatum* Schott** in GBIF Secretariat. Disponível em: <https://doi.org/10.15468/39omei> Acesso em: 28 de nov. de 2023.

RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro* **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.190-195, 2009.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023

RODRIGUEZ, J. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento de plantas. **Sitientibus**, n. 07, 1987.

ROYAL BOTANIC GARDENS, Kew. ***Philodendron subhastatum* K. Krause** em CATE Araceae. Disponível em: <https://doi.org/10.15468/duwkg1>. Acesso em 28 de nov. de 2023.

RIBEIRO, Y. R. et al. Enraizamento *ex vitro* de plântulas micropropagadas de *Cedrela fissilis*, uma espécie arbórea ameaçada de extinção. **Confict**, 2014.

RODRIGUES, D. T. et al. Resposta de explantes de *Epidendrum ibacuense* (Orchidaceae) a diferentes concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e a diferentes antioxidantes. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 905-908, 2007.

RODRIGUES, D. T. Resposta de explantes de *Epidendrum ibacuense* (Orchidaceae) a diferentes concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e a diferentes antioxidantes, 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais / 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas / 1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas. **Anais...**, Goiânia, Goiás, 2007.

RODRIGUES, P. F. A.; FACUNDES, A. S; PEREIRA, L. A. *Philodendron Schott* (Araceae Juss.) no distrito do Carvão, Mazagão, Amapá, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 15, n. 2, p. 421-431, 2020.

RUGGE, B. A. Micropropagation of *Protea repens*. In: **III International Protea Research Symposium 387**. p. 121-128, 1993.

SCHIAVINATO, Y. D. O. et al. Micropropagation of *Anthurium plowmannii* Croat. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2008

SCHINOR, Evandro Henrique et al. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 463-466, 2006.

SEHGAL, D.; KHAN, T. **Plant Tissue Culture: Beyond Being a Tool for Genetic Engineering**. Environmental Microbiology and Biotechnology: Volume 1: Biovalorization of Solid Wastes and Wastewater Treatment, p. 175-200, 2020.

SILVA, J. A. P. **Interações ecológicas de *Philodendron adamantinum* (Araceae, Philodendreae) no Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais: polinização por besouros e interação com formigas**. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

SILVA, M. J. *et al.* Indução de calos em explantes de *Neoregelia* sp. cultivados em diversos meios de cultura. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 1080-1080, 2007.

SOARES, M. L. et al. Three new species of *Philodendron* (Araceae) from the ducke forest reserve, central Amazonas, Brazil. **Feddes Repertorium**, v. 112, n. 1, p. 37-45, 2001.

NETO, S. P. **Cultura de tecidos como ferramenta na produção de mudas**. 2009. Disponível em:  
<https://www.paginarural.com.br/artigo/1912/cultura-de-tecidos-como-ferramenta-na-producao-de-mudas>. Acesso em: 20 de nov. de 2023.

SILVEIRA, D. G. *et al.* Embriogênese somática em caroá. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 1319-1323, 2007.

SOARES, E. L. **Regeneração *in vitro*, estudos histológicos e transformação genética da momoneira (*Ricinus communis*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SOARES, M.L. MAYO, J., Three new species of *Philodendron* (Araceae) from the ducke forest reserve, central Amazonas, Brazil. **Feddes Repertorium**, v. 112, n. 1, p. 37-45, 2001.



SOUZA, P. G *et al.* Estruturas mediadoras da polinização em *Philodendron adamantinum* mart. ex schott (ARACEAE): morfologia e aspectos funcionais. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

SREEKUMAR, S.; MUKUNTHAKUMAR, S.; SEENI, S. Morphogenetic responses of six *Philodendron* cultivars *in vitro*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, 2001.

TEMPONI, L. G. *et al.* Diversidade morfológica e formas de vida das Araceae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. **Rodriguésia**, v. 56, p. 03-13, 2005.

VELOSO, Gilzeni *et al.* Cultivo *in vitro* *cattleya violacea rolfe* 1889 (orchidaceae) utilizando meios de cultura alternativos. 2012.

VENDRUSCOLO, E. P. *et al.* **Cultura de tecidos de plantas no apoio ao melhoramento genético vegetal e à produção massal de plantas**. TCC (Graduação em Agronomia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

VENTURELLI, A. C. *et al.* Avaliação microbiológica da contaminação residual em diferentes tipos de alicates ortodônticos após desinfecção com álcool 70%. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, p. 43-52, 2009.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Indução de brotações e assepsia de explantes de mamoeiro cv. Tainung 01 visando à micropropagação. **Agropecuária Catarinense**, v. 28, n. 1, p. 57-60, 2015.

VIEIRA, M. R. S, *et al.* Métodos de assepsia na multiplicação *in vitro* da bananeira ‘Pacovan’ (*Musa* spp.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, 2021.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: Princípios e técnicas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2013.

YOSHIKO, A. S. *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 888 p.