



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – CAMPUS DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

Flávia Regina da Silva do Espírito Santo

Estabelecimento *in vitro* de *Chamaecostus subsessilis* (Costaceae):
estratégias de assepsia para subsidiar micropropagação e conservação *ex situ*

Brasília - DF
2025

MESTRADO EM BOTÂNICA

Flávia Regina da Silva do Espírito Santo

Estabelecimento *in vitro* de *Chamaecostus subsessilis* (Costaceae): estratégias de assepsia para subsidiar micropropagação e conservação *ex situ*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Botânica pela Universidade de Brasília.

Thiago José de Carvalho André
Orientador

Inaê Mariê Araújo Silva-Cardoso
Coorientadora

Brasília - DF
2025

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

DEDICO

À minha amada mãe, Maria José da Silva (*in memoriam*), que sempre esteve ao meu lado, oferecendo apoio e força para que eu pudesse enfrentar os obstáculos da vida. Sou eternamente grata pela alegria que demonstrou em cada uma das minhas conquistas, permanecendo feliz por elas até o seu último suspiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre dos mestres, ao Rei dos reis, Àquele que é finte inesgotável de poder, conhecimento e majestade: Meu Deus

Ao meu esposo, Wagner Martins dos Santos, pela confiança em minha capacidade, pelo incentivo e

por estar sempre ao meu lado apoiando cada um dos meus sonhos. Que possamos seguir juntos nessa caminhada da vida. Agradeço, ainda, por ter compartilhado comigo o maior presente que poderíamos receber: nossa pequena Catarina Yuni, que todos os dias me transforma em uma pessoa melhor. Filha, te amarei eternamente.

Aos meus irmãos, Adriana, Eliane, Ney e Bruna, pela força nos momentos mais difíceis e por serem pessoas em quem sempre posso confiar. Ao meu sobrinho Heitor, que ilumina nossa família com sua alegria e inteligência.

Ao meu orientador, Dr. Thiago André, pela oportunidade de ingresso na pós-graduação, pelos ensinamentos transmitidos nas aulas e no clube de leitura, bem como pelas experiências enriquecedoras proporcionadas nos trabalhos de campo.

À minha coorientadora, Dra. Inaê Marie de Araújo, pela dedicação, pelas orientações nas práticas, pelo apoio constante no esclarecimento das dúvidas e por ser uma profissional inspiradora.

Às minhas amigas Karenina, Késia, Lilian e Renata, pela presença acolhedora, pelo apoio incondicional e pelas risadas que tornaram esta jornada mais leve e feliz. Aos colegas do Departamento de Botânica — Júlia, Rebeca, Cinthia, Scheila, Raiane, Sabrina, Nathaly,

Ana Vitória, Thamilles, Eduardo Severo, Fábio Nakamura, Daniela e Valéria — pela amizade, pela troca de conhecimentos e pelo apoio mútuo. Tenho certeza de que são amizades que levarei para toda a vida.

Aos colegas da Direção do Instituto de Biologia — Maria, Bruna, Aline, Gabriel e Pablo — pelo apoio na impressão dos trabalhos desenvolvidos durante a pós-graduação, bem como pela organização e agendamento da defesa

À técnica de laboratório Alyne, do Laboratório de Cultura do CRAD, e ao assistente administrativo Natanael, pela colaboração nas práticas e pela paciência em esclarecer dúvidas.

Aos alunos de Iniciação Científica, Estela e Eduardo, que gentilmente dedicaram parte de seu tempo para me auxiliar nas coletas de campo e no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus chefes do Departamento de Botânica, Profs. Drs. Igor Campos, Júlia Sonsin, Lúcio Flávio, Luiz Alfredo e Sueli Gomes, pela compreensão e pelo apoio ao me liberarem para assistir às aulas e desenvolver minhas pesquisas práticas.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. A. Planta nativa de *Chamaecostus subsessilis* na região de Fercal (DF); B. Folha de *C. subsessilis* evidenciando a pilosidade; C. Indivíduos nativos de *C. subsessilis* em Fercal (DF); D. Detalhe do caule com nó e entrenó (indicado pela seta preta); E. Planta jovem de *C. subsessilis* com rizoma visível 17

PROTOCOLOS INICIAIS PARA CULTURA *IN VITRO* DE *CHAMAECOSTUS SUBSESSILIS* VISANDO MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU*

Figura 2. Distribuição geográfica das espécies de *Chamaecostus* na América do Sul. Os pontos coloridos representam registros de ocorrência de cada espécie: vermelho – *C. cuspidatus*; amarelo – *C. subsessilis*; azul claro – *C. congestiflorus*; roxo – *C. lanceolatus*; azul escuro – *C. fusiformis*; verde – *C. fragilis*; rosa – *C. Curcumoides*.....40

Figura 3. Assepsia de explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* para estabelecimento *in vitro*. Plantas mantidas em casa de vegetação do CRAD/UnB. Folhas recém-coletadas. Higienização em água e sabão neutro. Explantes foliares submetidos aos diferentes tratamentos de assepsia no fluxo laminar. Fragmentos

(1 cm²) inoculados em placas de Petri com meio MS43

Figura 4. Fluxo experimental dos ensaios com pré-pulverização. Plantas em casa de vegetação sob dois regimes de pré-pulverização. Aplicação de Cercobin® 1% (3×/dia). Coleta das folhas. Lavagem com detergente neutro. Etapas sequenciais de assepsia no fluxo laminar (álcool 70% → NaClO → HgCl₂). Explantes foliares (cerca de 1 cm²) inoculados com a face abaxial em contato com o meio MS. Incubação das placas a aproximadamente 23 °C no escuro dentro de caixa de papelão 46

Figura 5. Placas contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) esterilizado e manipuladas sob condições assépticas dentro do fluxo laminar; Inoculação de disco micelial no centro do BDA já solidificado. Fungos em crescimento em meio BDA após incubação a 23 °C, 16 h/8 h (luz/escuro), placas seladas e invertidas47

Figura 6. Equipamento de NanoDrop usado para análise das concentrações de DNA nas amostras dos fungos49

Figura 7. Processo de inclusão das amostras Historesina. Material de inclusão (pré-infiltração e infiltração da Leica. Material em moldes de silicone dentro da estufa. Cubos de madeira com as amostras. Micrótomo

rotativo. Resina utilizada para selar os cortes. Cortes anatômicos de explante de *Chamaecostus subsessilis*. Visualização dos cortes em Fotomicroscópio.....51

Figura 8. Aspectos da contaminação fúngica em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 1. Tratamento 1 com 0,2% de NaClO e 0,03% HgCl₂. Tratamento 2, com 0,5% de NaClO e 0,03% Hgcl₂. Tratamento 3, com 0,5% de NaClO e 0,05% HgCl₂. Tratamento controle, sem aplicação de agentes desinfestantes.....52

Figura 9. Percentual médio de contaminação fúngica, bacteriana e simultânea em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* submetidos a diferentes tratamentos de assepsia com fungicida (Experimento 2). As barras indicam o erro padrão. Letras iguais sobre as barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 54

Figura 10. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 2 de assepsia. Placa tomada por contaminação fúngica branca (círculo pontilhado vermelho). Placas apresentando contaminação simultânea por fungos e bactérias. Placas com menor contaminação fúngica e predominância bacteriana (seta preta). Explante com contaminação fúngica evidente. Presença concomitante de fungos e bactérias. Contaminação bacteriana com formação de rastros (seta). Barras = 2 cm 55

Figura 11. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 3 (assepsia com imersão em Cercobin® 0,5%, por diferentes tempos). Explantes submetidos à imersão por 2 h, 5 h e 10 h, em tratamentos sem e com adição de ampicilina ao meio de cultivo, avaliados aos 7 e 30 dias. As setas pretas indicam contaminação bacteriana localizada, enquanto a seta branca destaca uma placa totalmente tomada por contaminação fúngica. Exemplos de contaminação bacteriana em explantes foliares, caracterizada por coloração marrom, formação de rastros e crescimento em aglomerados 58

Figura 12. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 4 (pulverização prévia das plantas-matrizes com Cercobin® 700 a 1%). Tratamento 1, plantas pulverizadas por 7 dias, com destaque para a placa analisada (círculo pontilhado). Tratamento 2, plantas pulverizadas por 10 dias, com placa analisada em destaque (círculo pontilhado). Controle, plantas sem pulverização, com placa analisada (círculo pontilhado). Explante amarelado (seta vermelha), oxidação do tecido (seta laranja) e contaminação mista (seta preta). Exemplos de contaminação mista (seta preta).....63

Figura 13. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 4. Tratamento 1: explantes oriundos de plantas pulverizadas com Cercobin® a 1% por 7 dias, apresentando placa totalmente contaminada por fungos (indicada pelos pontilhados vermelhos) aos 30 dias de cultivo. Tratamento 2: explantes oriundos de plantas pulverizadas com Cercobin 700 a 1% por 10 dias, com placa sem contaminação por microrganismos (indicada pelos pontilhados lilases) aos 30 dias de cultivo. Controle:

explantes de contaminados por fungos. Placa completamente tomada por contaminação fúngica. Explante com aspecto amarelado (seta vermelha). Explante com sinais de oxidação (seta preta) 64

Figura 14. Aspectos morfológicos de fungos associados a explantes de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 4. Colônias de fungos com coloração creme-amarelada com textura rugosa e aspecto cerebriforme observadas em estereomicroscópio Leica M205C em Lupa. Estruturas fúngicas visualizadas em microscópio óptico (40x). Barra = 2 cm 65

Figura 15. Aspectos da contaminação fúngica em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* submetidos ao tratamento com imersão em peróxido de hidrogênio por 10 minutos (Experimento 5). Explantes com presença de contaminação fúngica. Explantes com contaminação total após o mesmo tratamento. Diferentes exemplos de colônias fúngicas observadas nos explantes 66

Figura 16. Contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 6, cultivados em meio suplementado com Dioxiplus® e submetidos à imersão em peróxido de hidrogênio por 10 ou 20 minutos. Explantes apresentando contaminação fúngica total, independentemente do tempo de imersão 67

Figura 17. Caracterização morfológica de contaminantes fúngicos em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento. Explantes com contaminação fúngica em todas as repetições do tratamento..... 68

Figura 18. Caracterização morfológica de contaminantes fúngicos em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 7. Morfologia de colônias fúngicas, incluindo colônias brancas de aspecto aveludado e colônias creme de textura rugosa. Estruturas fúngicas observadas em corte anatômico sob microscópio óptico (40×). Barra = 2 cm 68

Figura 19. Fungos isolados de *Chamaecostus subsessilis* crescidos após 7 dias de incubação em BDA 69

Figura 20. Perfil eletroforético do DNA genômico extraído de isolados fúngicos. Gel de agarose a 2% visualizado sob luz UV. *Ladder*: marcador de peso molecular; colunas 1 a 10: amostras de DNA genômico de diferentes isolados de fungos..... 70

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando o DNA de fungos associados a explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis*, obtido no Experimento 3 após reação de PCR. *Ladder*: marcador de peso molecular; colunas 1–10: amostras de DNA de isolados fúngicos 70

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando o DNA de fungos isolados após PCR. As amostras 7 (T3R1), 9 (T3R2) e 10 (T2R1), referentes ao Experimento 3. *Ladder*: marcador de peso molecular 71

LISTA DE TABELAS

PROTOCOLOS INICIAIS PARA CULTURA *IN VITRO* DE *CHAMAECOSTUS SUBSESSILIS* VISANDO MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU*

Tabela 1. Tratamento com fungicida Cercobin® (1%) realizado na casa de vegetação do Centro de Referência em Conservação da Natureza de Áreas Degradadas da Universidade de Brasília	80
Tabela 2. Síntese do delineamento dos sete experimentos de estabelecimento/aspepsia em <i>Chamaecostus</i>	44
Tabela 3. Relação dos fungos contaminantes obtidos de explantes de <i>Chamaecostus subsessilis</i> destinados à extração de DNA.....	80
Tabela 4. Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene ITS, com suas respectivas Referências.....	81
Tabela 5. Composição da reação de PCR recomendada para amplificação da região ITS, utilizando tampão de PCR (Mg ²⁺ plus)	81
Tabela 6. Percentual de contaminação (fungos e bactérias) em explantes foliares de <i>Chamaecostus subsessilis</i> introduzidos <i>in vitro</i> no Experimento 3, com e sem adição de antibiótico (ampicilina), aos 7 e 30 dias de cultivo. Valores expressos como média ± erro padrão	56
Tabela 7. Médias (± erro-padrão) da contaminação fúngica, bacteriana, oxidação e amarelecimento em explantes foliares de <i>Chamaecostus subsessilis</i> (Experimento 3) obtidos de plantas-matrizes pulverizadas com Cercobin® (1%) por 7 dias (T1), 10 dias (T2) ou sem aplicação (T3, controle). Avaliações realizadas aos 7 e 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com espectinomicina (150 mg L ⁻¹), BAP (2 mg L ⁻¹) e cinetina (2 mg L ⁻¹). Valores expressos em porcentagem de explantes afetados. Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	59
Tabela 8. Análise de pureza e concentração de DNA/RNA obtida por espectrofotometria (Nanodrop), com valores de concentração (ng/μL) e razões de absorbância A260/A280.....	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido Diclorofenoxiacético
AA	Ácido Ascórbico
AIA	Ácido Indolacético
BAP	6-benzilaminopurina
BDA	Batata-Dextrose-Agar
CIA	Clorofórmio: Álcool Isoámilico
ClO₂	Dióxido de Cloro
CRAD	Centro de Referência em Conservação da Natureza de Áreas Degradadas
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Trifosfato de Nucleótido de Desoxirribose
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
FAA	Formaldeído, Ácido Acético Glacial e Álcool 50%
HCl	Ácido Clorídrico
HgCl₂	Cloreto de Mercúrio
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
IAA	Ácido Indolacético
IBA	Ácido Indol-3-Butírico
ITS	Espaçador Transcrito Interno
KIN	Cinetina
MBG	Missouri Botanical Garden
MgCl	Cloreto de Magnésio
MS	Murashige & Skoog
NAA	Ácido Naftalenoacético
NaCl	Cloreto de Sódio
NaClO	Hipoclorito de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGR	Regulador de Crescimento de Plantas
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido Ribonucleico
SH	Schenk e Hildebrandt
TBE	(Tris/Borato/EDTA)
TDZ	Thidiazuron
TRIA	Triacantanol

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Costaceae e <i>Chamaecostus</i> : Taxonomia, morfologia e distribuição.....	18
3.2 Potencial ornamental/etnobotânicas e uso bioativos em Costaceae: evidências e lacunas	19
3.3 Micropropagação de plantas: princípios, etapas e desafio	20
3.4 Micropropagação em Costaceae: síntese de protocolo e evidências	24
3.5 Identificação de fungos endofítico por marcadores ribossomais(ITS): fundamentos e aplicações	26
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICA	27
Protocolos iniciais para Cultura <i>in vitro</i> de <i>Chamaecostus subsessilis</i> visando micropropagação e conservação <i>ex situ</i>	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 Condições Gerais/ material vegetal, assepsia e cultivo	42
2.2 Descrição dos experimentos (apenas variações em relação ao item 2.1)	44
Experimento 1	44
Experimento 2	45
Experimento 3	45
Experimento 4	45
Experimento 5	46
Experimento 6	46
Experimento 7	46
2.3 Inoculação dos fungos em meio BDA (Batata-Dextrose- Agar)	47
2.4 Extração de DNA dos fungos	47
2.5 Amplificação do DNA (PCR) da região ITS-r DNA	49
2.6 Aplicações da historesina na caracterização estrutural de tecidos vegetais do <i>Chamaecostus subssessilis</i>	50

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1	Experimento de Assepsia	51
3.2	Identificação de contaminação fúngicas por inoculação em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar)	68
3.3	Estabelecimentos de Banco de DNA de contaminantes fúngico para diagnose molecula	69
4	CONCLUSÕES.....	72
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
6	ANEXOS	80
	APÊNDICE A: In vitro establishment of <i>Chamaecostus subsessilis</i> (Costaceae): a test of aseptic strategies to support micropropagation for ex situ conservation	1
	Abstract	2
	Introduction	3
	Materials and Methods	5
	Results and Discussion	9
	Acknowledgments	20
	Authors' Contributions	20
	Conflict of Interest Statement	20
	Data Availability	21
	References	21
	Table	26

RESUMO

Espécies vegetais tropicais estão cada vez mais ameaçadas por fatores como desmatamento, mudanças climáticas e outras atividades antrópicas, que levam à perda de habitat e ao declínio de populações. A preservação dessas espécies requer estratégias de conservação tanto *in situ*, preservando os indivíduos em seus habitats naturais, quanto *ex situ*, utilizando técnicas que permitam sua manutenção e propagação fora do ambiente natural. Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais surge como uma ferramenta promissora, permitindo a multiplicação rápida e em larga escala de plantas com potencial ornamental, medicinal ou ecológico, especialmente aquelas com risco de extinção ou com difícil propagação por métodos convencionais. A espécie *Chamaecostus subsessilis* C.D.Specht é uma erva endêmica da América do Sul, pertencente à família Costaceae, grupo que inclui plantas de interesse paisagístico e terapêutico. No Brasil, *C. subsessilis* ocorre Cerrado e nas suas transições com a Amazônia e a Mata Atlântica e destaca-se pelo seu valor ornamental, adaptabilidade e potencial para uso medicinal. Apesar de sua relevância, não existia até então estudos sobre sua micropropagação, o que limita estratégias de conservação e a exploração sustentável da espécie para fins paisagísticos e farmacológicos. Portanto, desenvolver protocolos de cultura de tecidos *in vitro* para *C. subsessilis* é essencial para sua conservação *ex situ*, incluindo seu uso em programas de paisagismo e preservação de recursos genéticos vegetais.

Palavras-chaves: Cultura *in vitro*, Conservação *ex* e *in situ*, Contaminação, Micropropagação

ABSTRACT

Tropical plant species are increasingly threatened by factors such as deforestation, climate change, and other anthropogenic activities, which lead to habitat loss and the decline of populations. The preservation of these species requires conservation strategies both *in situ*, by protecting individuals in their natural habitats, and *ex situ*, through techniques that allow their maintenance and propagation outside their natural environment. In this context, plant tissue culture emerges as a promising tool, enabling the rapid and large-scale multiplication of plants with ornamental, medicinal, or ecological potential, especially those at risk of extinction or difficult to propagate using conventional methods. *Chamaecostus subsessilis* is a understory ground-herb endemic to South America, belonging to the Costaceae family, a group that includes plants of ornamental and therapeutic interest. In Brazil, *C. subsessilis* occurs in Cerrado savannas and its ecotones with Amazonia and Atlantic Rainforest and stands out for its ornamental value, adaptability, and medicinal potential. Despite its relevance, up to now, no study has addressed its micropropagation, which limits conservation strategies and the sustainable utilization of the species for landscaping and pharmacological purposes. Therefore, developing *in vitro* tissue culture protocols for *C. subsessilis* is essential not only for its *ex-situ* conservation but also to enhance its application in landscaping programs and the preservation of plant genetic resources.

Keywords: *In vitro* culture, *Ex situ* conservation, Contamination, Micropropagation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Medidas práticas e eficazes para a conservação de espécies tropicais constituem uma questão premente. A sobrevivência das espécies vegetais enfrenta ameaças múltiplas e complexas, como o desmatamento, as mudanças climáticas e o extrativismo desenfreado, o que demanda a implementação urgente de estratégias de conservação, que incluam abordagens *in situ* e *ex situ*. A conservação *ex situ* de longo prazo de espécies selecionadas exigirá coleções vivas, bem como um conjunto de tecnologias envolvendo expertise em criobiotecnologia, biologia de sementes, fisiologia vegetal, cultura de tecidos, ecologia vegetal e horticultura Pence et al. (2022).

Conforme Skinner e Milward-de-Azevedo (2018), a conservação *ex situ* corresponde à manutenção da biodiversidade fora de seus ambientes naturais. Devido às crescentes taxas de destruição de habitats e perda de espécies, a conservação *ex situ* envolve a amostragem, transferência e armazenamento dos espécimes. Silveira *et al.* (2018) informaram que, atualmente, cerca de 21% das espécies ameaçadas conhecidas estão conservadas *ex situ*, seguindo o que foi estabelecido na Meta 8 da Estratégia Global de Conservação de Plantas, que prevê a adição de 75% de espécies ameaçadas em coleções, e 20% em programas de restauração ecológica. Assim sendo, a conservação *ex situ* tem um papel importantíssimo na recuperação das espécies raras, visto que é uma forma de proteção e crescimento de plantas endêmicas no Brasil. As áreas com alto nível de endemismos, como o Cerrado, merecem prioridades de conservação, pois como abrigam espécies únicas, essas tornam-se mais susceptíveis ao desaparecimento como consequência da destruição do habitat, coleta excessiva e introdução de espécies exóticas (Las-Casas, 2000).

A cultura de tecidos *in vitro* provê ambiente controlado (meio, luz, temperatura e assepsia) para multiplicação rápida e suporte à conservação *ex situ*. Ainda assim, a micropropagação enfrenta entraves recorrentes, como contaminação, escurecimento/oxidação, enraizamento difícil, falhas na aclimatização, necrose apical, recalcitrância e anomalias morfogênicas (Abdalla et al., 2022). Nas últimas décadas, as técnicas *in vitro* tornaram-se centrais para a recuperação de espécies ameaçadas e para a produção de material de qualidade. Durante os últimos anos, a cultura *in vitro* emergiu como uma ferramenta poderosa para a propagação eficaz de muitas espécies de plantas, permitindo a clonagem e produção de muitos indivíduos a partir de um fragmento de tecido da planta mãe. O potencial dessas técnicas na recuperação de espécies ameaçadas é imenso (Wochok, 1981).

A contaminação é um dos maiores obstáculos ao estabelecimento *in vitro*: reduz a sobrevivência dos explantes e compromete a qualidade do material propagado. Ela pode ser

externa (meios, recipientes, ferramentas, superfícies, manipulação) ou interna (endófitos presentes no tecido vegetal). Protocolos clássicos de desinfestação superficial (p. ex., hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio) nem sempre eliminam microrganismos internos ou biofilmes; estudos recentes enfatizam ajustes de pré-tratamento de plantas- matrizes, tempos/concentrações de desinfestantes e, quando necessário, uso criterioso de antimicrobianos (antibióticos/antifúngicos) na fase de estabelecimento (Volk et al., 2022; Abdalla et al., 2022).

A análise de fungos endofíticos pode ser realizada por diferentes metodologias, tradicionalmente classificadas como dependentes ou independentes de cultivo, incluindo: (a) observação direta, (b) isolamento dos fungos com posterior identificação morfológica e/ou molecular e (c) extração total de DNA de tecidos vegetais para identificação molecular (Sun e Guo, 2012). Nesse contexto, a identificação molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) da região espaçadora transcrita interna (ITS, *Internal Transcribed Spacer*), aliada ao monitoramento sistemático das culturas, tem contribuído para detectar contaminações “silenciosas” associadas a endófitos fúngicos e orientar intervenções mais precisas (Liao et al., 2025).

O Brasil é mundialmente conhecido pela riqueza de sua biodiversidade, na qual se destacam as plantas ornamentais de valor comercial pouco explorado (Almeida e Aki, 1995). Muitas vezes o valor das plantas nativas ornamentais só é reconhecido quando elas são estudadas e melhoradas por outros países. Inúmeras espécies possuem características adequada ao uso no paisagismo, no entanto, vê-se uma exaustiva repetição de espécies que se tornaram consagradas e aceitas pela população, muitas delas inadequadas para o uso dado (Leal e Biondi, 2006). De acordo com Pires (2008), o paisagismo é uma atividade que organiza os espaços externos com o objetivo de proporcionar bem-estar aos seres humanos e de atender às suas necessidades, conservando os recursos desses espaços. A mesma autora resalta que as plantas utilizadas no paisagismo urbano são importantes na caracterização ambiental, pois promovem inúmeros benefícios estéticos e funcionais ao homem e estão muito além dos seus custos de implantação e manejo.

No gênero, *Chamaecostus* C.D.Specht, espécies de pequeno porte e inflorescências vistosas despontam com potencial para paisagismo; experiências consolidadas com *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, ilustram usos em jardins tropicais e flor de corte, sugerindo oportunidade semelhante para *C. subsessilis* (Kuhlmann et al., 2016). Contudo, a ausência de protocolos de estabelecimento *in vitro* e micropropagação limita a exploração sustentável e a conservação *ex situ* dessa espécie.



Figura 1. A. População nativa de *Chamaecostus subsessilis* na região de Fercal (DF); B. Folha de *C. subsessilis* destacando a pilosidade; C. Indivíduos nativos de *C. subsessilis* em Fercal (DF); D. Detalhe do caule com nó e entrenó (indicado pela seta preta); E. Planta jovem de *C. subsessilis* com rizoma visível. **Fonte:** Autora (2024).

Diante desse quadro, este trabalho focaliza a barreira crítica da contaminação no estabelecimento *in vitro* de *Chamaecostus subsessilis*. Ao testar procedimentos de assepsia, identificar contaminantes (morfologia e PCR/ITS) e avaliar agentes desinfestantes/antimicrobianos e seus efeitos sobre a sobrevivência e a oxidação de explantes, buscando viabilizar o estabelecimento inicial da espécie, etapa indispensável para protocolos subsequentes de micropropagação, aclimatização e conservação *ex situ*, além de futuras aplicações ornamentais e paisagísticas.

2. OBJETIVO GERAL

- Investigar estratégias para superar a contaminação endofítica e exógena em explantes de *Chamaecostus subsessilis*, visando possibilitar o estabelecimento *in vitro* da espécie como etapa fundamental para subsidiar protocolos futuros de micropropagação e conservação *ex situ*.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de agentes desinfestantes, fungicidas e antibióticos no estabelecimento *in vitro*, considerando taxas de sobrevivência, oxidação e escurecimento dos explantes;
- Produzir informações que subsidiem o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, aclimatização e conservação *ex situ* da espécie, bem como sua futura exploração ornamental e paisagística e
- Identificar os principais agentes contaminantes endofíticos e exógenos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Costaceae e *Chamaecostus*: taxonomia, morfologia e distribuição

A família Costaceae é dividida em sete gêneros (*Costus*, *Hellenia*, *Chamaecostus*, *Paracostus*, *Dimerocostus*, *Monocostus* e *Tapeinochilos*) (Specht, 2006). As espécies do gênero *Chamaecostus* são ervas terrestres que raramente ultrapassam um metro de altura; apresentam caule frágil e nós levemente geniculados, seus tricomas são unicelulares, e as folhas são elípticas a obovadas. Inflorescência ovoide a cilíndrica, com caule parcialmente coberto pelas brácteas, bractéolas tubulares e bicarenadas. A flor apresenta um labelo formado por estaminódios petaloides fundidos de comprimento longo, base estreita e ápice largo e o estigma é cupuliforme. Ramos aéreos costumam renascer na estação seca, reduzindo o indivíduo aos órgãos subterrâneos tuberosos de reserva (Fig. 1). O gênero *Chamaecostus* compreende oito espécies restritas à América do Sul, entre as quais menciona-se *C. subsessilis*. No Brasil, ocorrem sete espécies, principalmente em matas, em locais sombreado (André et al., 2015).

C. subsessilis é uma espécie amplamente distribuída, encontrada nas áreas de Cerrado do leste do Brasil e em toda a parte sul da floresta amazônica até a Bolívia (Skinner, 2012). A espécie é uma erva com caule reduzido e subterrâneo com ramos aéreos de até 1 m de altura e raízes tuberosas. As folhas apresentam número de 3 a 6, estão concentradas no ápice do caule e possuem membranáceas ou glabras (Fig. 1A) O pecíolo está ausente. A inflorescência apresenta de 1 a 4 flores, com brácteas verdes, membranáceas e foliáceas. A flor possui pedicelo, cálice branco, membranáceo e trilobado, com lobos triangulares de ápice mucronado. O labelo é amarelo, com a antera afixada na base do estame, que é fundido em um tubo. O ovário pode ser pubescente ou glabro. O fruto é uma cápsula com a semente negra e envolta por um arilo creme (Antar e Sano 2016). De acordo com esses autores, a *C. subsessilis* ocorre em florestas ombrófilas perenifólias, semidecíduas e decíduas, principalmente em cerradões e matas ciliares, podendo ser encontrada ocasionalmente em fendas de rochas. Na Serra do Cipó, foi observada em fase de florescimento nos meses de fevereiro e novembro, e com frutos no mês de dezembro, ocorrendo no interior da mata, próxima a corpos d'água.

As plantas da família Costaceae apresentam pequenas sementes ariladas, contidas em frutos capsulares de parede fina. Embora os mecanismos de dispersão de sementes ainda sejam pouco conhecidos, acredita-se que formigas e pássaros desempenhem um papel na dispersão de algumas espécies (Maas, 1972; Schemske, 1983). A dispersão por pássaros pode

aumentar significativamente as chances de colonização a longas distâncias, cruzando barreiras terrestres e aquáticas. Cápsulas flutuantes também poderiam contribuir para a dispersão a grandes distâncias através da água, embora a resistência das sementes nessas condições ainda não tenha sido avaliada (Specht, 2006).

No Brasil, a família é representada pelos gêneros *Chamaecostus*, *Costus* e *Dimerocostus*, abrangendo um total de 23 espécies nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal, distribuídas nos mais variados tipos de vegetação: Campinarana, Floresta Ciliar, Floresta de Galeria, Floresta de Igapó, Floresta de Terra Firme, Floresta de Várzea, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Perenifólia, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila, Palmeiral, Restinga, Savana Amazônica e Vegetação Aquática (Fernandes, 2021)

A maioria das espécies da família Costaceae ocorre em locais expostos a climas quentes e úmidos, como margens de florestas, estradas e áreas próximas a corpos d'água (Salinas, 2007). Essas espécies são polinizadas por abelhas ou beija-flores, porém as inflorescências são frequentemente visitadas por formigas, atraídas pelo néctar produzido pelos nectários nas brácteas e flores (Ribeiro et al., 1999; Stevens, 2021). As flores de *Costus spiralis* são adaptadas à polinização por beija-flores de bico longo da sub-família Phaethornithinae, pois apresentam tubo da corola levemente curvado e longo (Araujo e Oliveira, 2008).

As abelhas euglossinins são polinizadores importantes dos Zingiberales neotropicais (Zucchi et al., 1969; Williams, 1982), tendo começado a se diversificar aproximadamente entre 42 e 27 milhões de anos atrás (Ramírez et al., 2010).

3.2 Potencial ornamental/Etnobotânica e usos bioativos em Costaceae: evidências e lacunas

Algumas espécies da família Costaceae têm aplicação ornamental e medicinal. Conforme relatado por Souza e Lorenzi (2019) e Missouri Botanical Garden – MBG (2021) (Jardim Botânico do Missouri). O gengibre- abacaxi (*Tapeinochilos ananassae* (Hassk.) K.Schum.), espécie exótica no Brasil, originária da Austrália, Nova Guiné e Indonésia, é utilizado como ornamental devido às inflorescências que surgem diretamente dos rizomas. Castro et al. (2011) descreveram 12 espécies de Costaceae, tanto nativas quanto exóticas, com potencial ornamental no Brasil, com base no banco de germoplasma de Zingiberales ornamentais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Essas espécies, pertencentes aos gêneros *Costus*, *Cheilocostus* e *Dimerocostus*, são recomendadas para paisagismo, cultivo em

vasos e grandes recipientes, produção de flores de corte e comercialização das hastes foliares, com destaque para o gênero *Costus*, com nove espécies. Segundo Skinner (2016), as plantas de porte baixo do Brasil e de países vizinhos, pertencentes ao gênero *Chamaecostus*, são bem representadas pela popular planta de jardim de flores alaranjadas *C. cuspidatus*. O gênero *Chamaecostus* possui um destacado potencial ornamental, mostrando-se ideal para aplicações em paisagismo e conservação *ex situ*.

O extrato etanólico dos rizomas de *C. subsessilis* apresentou atividade citotóxica promissora, associada ao uso popular da família Costaceae no tratamento de tumores. Além disso, verificou-se a presença de saponinas, de dioscina e gracilina, as quais foram responsáveis por essa atividade (Siqueira et al., 2020)

De acordo com Maji et al. (2020), várias partes da planta *Hellenia speciosa* (J. Koenig) S.R. Dutta apresentam propriedades medicinais, com o rizoma se destacando por seu valor terapêutico. O suco do rizoma é utilizado no tratamento de inflamações, dores de cabeça, diabetes, hiperlipidemia e câncer, além de ser uma excelente fonte de antioxidantes. Em casos de febre alta, as folhas são aplicadas de forma esmagada.

Segundo Rodrigues et al. (2018), *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe, conhecida popularmente como cana- de-macaco ou cana-do-brejo é amplamente utilizada na medicina popular por suas propriedades depurativas, diuréticas e tônicas. Além disso, é empregada no tratamento de doenças como gonorreia, sífilis, nefrite, problemas na bexiga, diabetes, cólicas, irritações vaginais e úlceras. Além disso, quanto ao uso ornamental, a planta é cultivada em jardins devido ao efeito visual proporcionado por suas folhas e flores, que conferem um belo aspecto aos canteiros.

3.3 Micropropagação de plantas: princípios, etapas e desafio

A micropropagação ou propagação *in vitro* de plantas, é uma técnica de Cultura de tecidos que objetiva propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou quaisquer similares de vidro (por isso, o termo *in vitro*), sob condições padronizadas e controladas de nutrição, assepsia e fatores ambientais como luz, temperatura. (Barrueto Cid, 2001; Carvalho, 2006). Essa técnica possibilita a obtenção de um alto número de plantas em um reduzido espaço físico e de tempo, sendo então uma boa forma de multiplicação de indivíduos (Santos, 2003). A micropropagação pode ser realizada por diferentes vias, como proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias utilizando organogênese direta ou indireta e embriogênese somática (Grattapablia e Machado, 1998; Carvalho, 1999; Takahashi, 2002).

As técnicas de cultivo de tecidos podem oferecer ferramentas importantes para resolver problemas que limitam o crescimento dessa cultura ornamental de grande relevância. A propagação *in vitro* tem sido amplamente aplicada para produzir, em curto período e em qualquer época do ano, uma grande quantidade de mudas de alta qualidade, garantindo a autenticidade varietal (Oliveira et al., 2011).

Sendo a etapa inicial da micropropagação, a seleção do explante assume caráter de extrema relevância, devendo ser realizada a partir de plantas fiéis ao tipo, isentas de variações em relação às características agrônômicas desejáveis. Dentre os diversos tipos de explantes empregados na micropropagação de membros da família Zingiberaceae, destacam-se: gemas de rizoma (Zuraida et al., 2015; Rodpradit et al., 2017; Manisha et al., 2018; Sumon et al., 2019; Sahoo et al., 2020; Jena et al., 2020; Park et al., 2021), segmentos nodais (Nery et al., 2015), ápices de brotos (Ali et al., 2016; Rodpradit et al., 2017; Sumon et al., 2019; Malhotra et al., 2021), segmentos foliares (Kunene et al., 2018; Miri, 2020), segmentos radiculares (Ali et al., 2016; Kunene et al., 2018), pseudocaules (Sarma e Deka, 2020) e cormos (Kunene et al., 2018). A literatura científica aponta que gemas de rizoma jovens e saudáveis representam o explante mais adequado, em virtude de sua elevada capacidade de resposta ao crescimento *in vitro* (Zahid et al., 2021).

A principal limitação da eficácia da esterilização de tecidos durante o cultivo *in vitro* é a sensibilidade dos tecidos vegetais aos efeitos tóxicos dos agentes esterilizantes, bem como o acúmulo de infecções internas (Gammoudi et al., 2022; Agbadje et al., 2021; Anikina e Abiyeva, 2022).

Compostos como o hipoclorito de sódio (NaClO), possuem um amplo espectro de ação e podem atuar de maneira eficaz na desinfestação superficial dos explantes (Embrapa, 2008). O cloro, substância ativa do NaClO, penetra na célula do microrganismo por meio da membrana citoplasmática, interferindo nas proteínas e nos ácidos nucleicos (Ingram et al., 2003). Entretanto, outro aspecto a ser considerado para uma descontaminação eficiente dos tecidos é o tempo de exposição e a concentração dos agentes desinfestantes.

Khairudin e Hakiman (2020) realizaram a indução *in vitro* de brotos e raízes a partir de rizomas de *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker utilizando 6-benzilaminopurina (BAP), destacando a importância da assepsia superficial. Para isso, as gemas dos rizomas foram submetidas à esterilização com alvejante comercial (Clorox®) contendo 5,25% de hipoclorito de sódio. Os explantes foram imersos em frascos com soluções de Clorox® em diferentes concentrações (40, 50, 60, 70 e 80%), acrescidas de algumas gotas de Tween 20 (Polissorbato 20), agitando-se as amostras por 20 minutos. Em seguida, os rizomas foram enxaguados de três a cinco vezes com água destilada autoclavada, garantindo a completa remoção do

desinfetante antes da inoculação. Verificou-se que os rizomas de *K. parviflora* foram efetivamente estabelecidos *in vitro* quando submetidos à desinfestação superficial com Clorox® a 50%.

O primeiro passo para o estabelecimento de uma cultura *in vitro* é a desinfestação do explante. Nessa etapa, o uso de substâncias desinfestantes é essencial, pois atuam eliminando quaisquer microrganismos presentes nos explantes (Chaves; Schuch; Erig, 2005; Carvalho; Nascimento; Braga, 2006). O tipo de agente desinfestante e o tempo de exposição a esses produtos dependem muito dos explantes de assepsia.

Um desafio na desinfestação e no estabelecimento dos explantes *in vitro* é a oxidação, considera ser uma reação natural causada pela liberação de compostos fenólicos pelo próprio tecido (Handa; Sampaio; Quisen, 2005; Cançado et al., 2009). Além disso, os agentes desinfestantes podem causar necrose nos explantes, sem, contudo, eliminar a contaminação. Dessa forma, nas condições de tempo de exposição e concentração utilizadas, esses agentes não demonstram eficácia no processo de desinfestação.

Quando a ação do esterilizante primário não é suficiente, utiliza-se um agente secundário, como o Cloreto de Mercúrio (HgCl_2), que apresenta espectro antimicrobiano mais amplo que o hipoclorito de sódio e proporciona maior controle da contaminação bacteriana (Labrooy et al., 2020). Contudo, mesmo com a eficácia superior do cloreto de mercúrio, a taxa de sobrevivência dos explantes continua reduzida. Esse efeito é associado ao surgimento de necrose e à limitação do crescimento vegetal, decorrentes da ação corrosiva dos íons cloro presentes na molécula de HgCl_2 (Malik et al., 2020). Ainda assim, a utilização de uma solução mais diluída, a 0,1%, por um período de 3 a 10 minutos, seguida de diversas lavagens com água destilada estéril e álcool etílico para eliminar resíduos de íons Hg^{2+} , mostrou-se eficiente no controle da contaminação sem prejudicar a viabilidade dos explantes (Din et al., 2018). Em contrapartida, Mehaboob et al. (2019) relataram a aplicação de uma concentração mais elevada de HgCl_2 (1%) por um tempo reduzido de apenas 2 minutos.

De acordo com Subramanian et al. (2024), o meio de cultura basal constitui a principal fonte de suprimento nutricional para plantas cultivadas *in vitro*, englobando todos os elementos essenciais ao seu desenvolvimento — incluindo sais minerais e orgânicos, aminoácidos, vitaminas e fontes de carbono — os quais são fundamentais para assegurar o crescimento adequado e a correta diferenciação dos tecidos vegetais.

O crescimento de plantas em condições *in vitro* requer a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. A formação de brotações *in vitro* ocorre devido ao desequilíbrio hormonal gerado pela concentração adequada e equilibrada de reguladores vegetais incorporados ao meio (Monfort et al., 2012). Os principais tipos de reguladores, que

influenciam a micropropagação, são as citocininas e as auxinas, as quais desempenham um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do explante (Bielach et al., 2012).

Essas substâncias são indispensáveis para o desenvolvimento dos explantes e estão diretamente associadas à divisão celular e ao crescimento do meristema (Reis et al., 2008). As citocininas, como o 6- benzilaminopurina (BAP) atuam promovendo a quebra da dominância apical e a proliferação de gemas axilares, favorecendo o desenvolvimento da parte aérea. O BAP é a citocinina comercialmente disponível que apresenta os melhores resultados na micropropagação (Moura et al., 2012).

A auxina é um hormônio vegetal de baixa massa molecular considerado um dos mais relevantes do ponto de vista fisiológico (Porfírio et al., 2016), por estar diretamente envolvido em processos essenciais do crescimento e desenvolvimento das plantas (Wang et al., 2015). Além disso, trata-se de um ácido indólico caracterizado por apresentar uma cadeia lateral variável (Porfírio et al., 2016). De acordo com Todd et al., (2020), em altas concentrações, a auxina pode atuar como herbicida. Um exemplo é o 2,4-D (ácido 2,4- Diclorofenoxiacético), um herbicida sintético com ação auxínica e efeitos similares aos do Ácido Indolacético (AIA). Esse composto foi o primeiro a ser amplamente utilizado no controle de plantas daninhas dicotiledôneas (Porciuncula et al., 2020). Todd et al. (2020) também relatam que, em baixas concentrações, o 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) herbicida 2,4-D pode exercer uma função similar à do AIA, atuando como regulador do crescimento vegetal.

A aclimatização, considerada a etapa final da micropropagação, consiste na adaptação de plântulas cultivadas *in vitro* ao ambiente externo (Maravilha et al., 2023). O sucesso desse processo depende diretamente da taxa de sobrevivência das plântulas, podendo ser obtido por métodos simples e de baixo custo (Subramanian et al., 2024).

Em *Zingiber officinale* Roscoe, verificou-se uma taxa máxima de sobrevivência de 100% quando as plântulas foram aclimatizadas em uma mistura de solo orgânico e terra superficial na proporção de 1:1 (Zuraída et al., 2015). Em *Kaempferia parviflora*, registrou-se 98% de sobrevivência, com crescimento uniforme, quando cultivada em turfa, perlita e vermiculita na proporção 4:3:3 (v/v) (Park et al., 2021). Resultados comparáveis foram observados para *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, aclimatizada em solo, areia e estrume bovino na proporção de 1:1:1 (Jena et al., 2020).

O uso de um único substrato também se mostrou relevante, como evidenciado na aclimatização de microrrizomas de *Zingiber officinale* em cocopeat (casca do coco), que apresentou 88,3% de sobrevivência (David et al., 2018). Singh et al. (2015) aclimatizaram plântulas completas de *Curcuma longa* L. com microrrizomas em solo estéril, em casa de sombra com 80% de umidade relativa e fotoperíodo de aproximadamente 16 horas, sem

aclimatização prévia, obtendo ainda assim uma taxa de sobrevivência de até 80%.

3.4 Micropropagação em Costaceae: síntese de protocolos e evidências

A micropropagação, ou cultivo *in vitro*, tem se mostrado uma ferramenta essencial para as espécies da família Costaceae, como *Costus pictus*, *Hellenia speciosa* e *Costus igneus* Nak superando as limitações da propagação convencional, que incluem baixa viabilidade de sementes, taxas de germinação reduzidas e dificuldade de enraizamento de estacas (Malabadi et al., 2002; Ahmed e Kumar, 2009; Punyarani e Sharma, 2012; Wani et al., 2014; Bharathi et al., 2022;). Essas espécies são valorizadas por suas propriedades medicinais, como a atividade antidiabética e a produção de diosgenina, o que as torna alvos de superexploração e ameaças de extinção, justificando a necessidade de métodos eficientes de multiplicação e conservação (Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Malabadi et al., 2002; Punyarani e Sharma, 2012; Ramasubramaniyan et al., 2015; Roy e Pal, 1991; Wani et al., 2014). As atividades *in vitro* abrangem desde a propagação em larga escala e o melhoramento genético até a conservação do germoplasma (Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Coelho et al., 2020; Gaidamashvili e Benelli, 2021; Malabadi et al., 2002; Punyarani e Sharma, 2012; Roy e Pal, 1991; Wani et al., 2014).

As técnicas empregadas utilizam uma variedade de explantes, incluindo segmentos de rizoma e seções finas de rizoma, segmentos nodais de caule, folhas e, em alguns casos, plântulas oriundas de embriões zigóticos (Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Malabadi et al., 2002; Malabadi et al., 2005; Punyarani e Sharma, 2012; Ramasubramaniyan et al., 2015; Roy e Pal, 1991; Wani et al., 2014). O meio Murashige e Skoog (MS) é o mais frequentemente utilizado, por vezes em força total, meia ou um quarto, sendo frequentemente suplementado com reguladores de crescimento vegetal para otimizar as diferentes fases do cultivo (Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Malabadi et al., 2002; Punyarani e Sharma, 2012; Ramasubramaniyan et al., 2015; Wani et al., 2014). Para a indução e multiplicação de brotos, são comuns combinações de citocininas como BAP e cinetina (Kin), ou BAP e tidiazuron (TDZ) (Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Punyarani e Sharma, 2012; Wani et al., 2014). Por exemplo, para *C. pictus*, BAP (3-8 μ M) em combinação com ácido naftalenoacético (NAA) (0.6 μ M) ou BAP (2.5 mg/L) e KN (1.0 mg/L) são eficazes (Ahmed e Kumar, 2009; Punyarani e Sharma, 2012). Para *C. speciosus*, TDZ (0.5-2.0 mg/L) com BAP (0.5-2.0 mg/L) promove alta frequência de brotos (Bharathi et al., 2022), enquanto triacontanol (TRIA) (5 mg/L) também mostrou sucesso na regeneração de brotos (Malabadi et al., 2005).

A indução de calos é bem-sucedida a partir de explantes foliares, utilizando 2,4-D,

TDZ e ácido indol- 3-acético (IAA) (Bharathi et al., 2022; Ramasubramaniyan et al., 2015; Wani et al., 2014). O enraizamento geralmente é otimizado em meio MS de força reduzida, com auxinas como IAA e ácido indol-3-butírico (IBA) (Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Punyarani e Sharma, 2012). Para *C. pictus*, 8 µM de IAA e 3 µM de BAP são ideais para o enraizamento, enquanto para *C. speciosus*, 1 mg/L de IAA e 0.5 mg/L de IBA resultam em excelente enraizamento (Bharathi et al., 2022; Punyarani e Sharma, 2012). O TRIA (2 mg/l) também é eficaz para o enraizamento de *C. speciosus* (Malabadi et al., 2005). A produção de rizomas *in vitro* é uma aplicação notável para o gênero; para *C. speciosus*, rizomas aéreos e basais foram induzidos em meio Schenk e Hildebrandt (SH) suplementado com sulfato de adenina e casaminoácidos (Roy e Pal, 1991). Já para

C. pictus, microrrizomas foram induzidos em meio MS de meia força com NAA, BAP e sacarose sob condições de estresse, como fotoperíodo reduzido (Punyarani e Sharma, 2012). Culturas de suspensão celular também foram estabelecidas para *C. pictus*, o que representa um avanço para estudos e produção em larga escala de componentes farmacêuticos (Wani et al., 2014).

Os desafios comuns no cultivo *in vitro* incluem a contaminação microbiana (interna e externa), que é combatida por esterilização de superfície com agentes químicos (álcool, hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio) e, por vezes, fungicidas ou antibióticos (Abdalla et al., 2022; Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Punyarani e Sharma, 2012; Ramasubramaniyan et al., 2015; Wani et al., 2014). A oxidação fenólica e o escurecimento dos explantes são outros problemas, controlados por antioxidantes como carvão ativado ou ácido ascórbico - AA - (Abdalla et al., 2022; Ahmed e Kumar, 2009; Gaidamashvili e Benelli, 2021).

A dificuldade de enraizamento, variações somaclonais devido a longos períodos de cultura e o uso de reguladores de crescimento de plantas (PGRs) em alta concentração, e a hiper-hidricidade são obstáculos frequentemente encontrados e abordados com ajustes no meio de cultura e nas condições ambientais (Abdalla et al., 2022; Ahmed e Kumar, 2009; Bharathi et al., 2022; Coelho et al., 2020; Gaidamashvili e Benelli, 2021). A dormência de gemas axilares, um problema natural em espécies de *Costus*, pode ser quebrada com a decapitação do ápice do broto ou o uso de reguladores de crescimento específicos (Punyarani e Sharma, 2012). Finalmente, a

aclimação das plântulas regeneradas é uma etapa crucial para o sucesso da micropropagação, com taxas de sobrevivência geralmente altas (80-100%) após a transferência para condições *ex vitro* (Roy e Pal, 1991; Malabadi et al., 2005; Ahmed e Kumar, 2009; Punyarani e Sharma, 2012; Bharathi et al., 2022).

3.5 Identificação de fungos endofíticos por marcadores ribossomais (ITS): fundamentos e aplicações

Os microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem dentro das plantas sem causar danos a elas. Eles desempenham papéis fundamentais na vitalidade da planta hospedeira. A interação entre o endófito e a planta pode ser descrita como uma relação simbiótica, uma vez que ambos se beneficiam dessa associação. A planta hospedeira fornece um ambiente protetor para os microrganismos (Santos et al., 2018).

A identificação e classificação de fungos tradicionalmente baseiam-se na análise de estruturas macroscópicas e microscópicas (Larone, 2002; Watanabe, 2002), cujas características podem variar significativamente de acordo com o ambiente e as condições a que estão expostas. Dessa forma, métodos moleculares são ferramentas auxiliares na diferenciação de microrganismos (Jimenez et al., 1999; Mirhosseini et al., 2011).

Uma alternativa para a identificação e diferenciação de espécies de fungos com o uso de PCR (Polymerase Chain Reaction), é a utilização de *primers* específicos para determinadas regiões. As regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA capazes de auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies (Chen et al., 2004). A identificação de fungos endofíticos tem sido realizada por meio de regiões ITS que fornecem a possibilidade da identificação de gêneros de fungos isolados de plantas, pela amplificação e sequenciamento desses isolados confrontados com banco de dados (Azevedo et al., 2002), possibilitando sua utilização futura em processos biotecnológicos.

A região espaçador transcrito interno pode ser amplificada a partir de muitos táxons fúngicos usando um conjunto limitado de *primers*. Assim, o ITS é usado como uma região de código de barras universal (Schoch et al. 2012; Li et al. 2011). Esse nível de polimorfismo torna a região ITS uma candidata forte e válida para o código de barras de DNA fúngico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, N.; EL-RAMADY, H.; SELIEM, M. K.; EL-MAHROUK, M. E.; TAHA, N.; BAYOUMI, Y.; SHALABY, T. A.; DOBRÁNSZKI, J. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae*, v. 8, n. 8, p. 677, 2022.
- AGBADJE, E. T. A. E.; AGBIDINOUCOUN, A.; ZANDJANAKOU TACHIN, M.; CACAÏ, G. T. H.; AHANHANZO, C. Mass production of bananas and plantains (*Musa* spp.) plantlets through in vitro tissue culture partway: a review. *European Journal of Biology and Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 1–8, 2021.
- AHMED, B. A. A.; KUMAR, A. R. In vitro propagation of monocot (*Costus pictus* D. Don) – an antidiabetic medicinal plant. *Journal of Agricultural Technology*, v. 5, n. 2, p. 361–369, 2009.
- ALI AMA, E. N. M.; YAGI, S. M. Callus induction, direct and indirect organogenesis of ginger (*Zingiber officinale* Rosc). *African Journal of Biotechnology*, v. 15, p. 2106–2114, 2016.
- ALMEIDA, F. R. F.; AKI, A. Y. Grande crescimento no mercado das flores. *Agroanalysis*, Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, p. 8–11, 1995.
- ANDRÉ, T.; SPECHT, C. D.; SALZMAN, S.; PALMA-SILVA, C.; WENDT, T. Evolution of species diversity in the genus *Chamaecostus* (Costaceae): molecular phylogenetics and morphometric approaches. *Phytotaxa*, v. 204, n. 4, p. 265–276, 2015.
- ANIKINA, I.; ABIYEVA, A. Specific features of sterilization technologies of the in vitro culture of the plant *Circaea lutetiana* L. *AIP Conference Proceedings*, v. 2467, n. 1, p. 070039, 2022.
- ANIKINA, I.; KAYNIDENOV, N.; TURISTA, D. D. R.; KUKUSHEVA, A.; TOKBERGENOVA, Z.; TUGANOVA, B.; SEYTKHANOVA, K.; KALIYEVA, A. Control of contamination of tissue plant cultures during in vitro clonal micropropagation. *OnLine Journal of Biological Sciences*, v. 25, n. 2, p. 333–342, 2025. DOI: 10.3844/ojbsci.2025.333.342.
- ANTAR, G. M.; SANO, P. T. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Costaceae. *Boletim de Botânica*, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2016.
- ARAÚJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. *Rodriguésia*, v. 59, n. 1, p. 179–191, 2008.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. de (Orgs.). *Biotecnologia: avanços na agricultura e na*

agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 235–268.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isto? *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, n. 19, p. 16–21, 2001.

BHARATHI, J. K.; ANANDAN, R.; RAMESHKUMAR, S.; MENAKA, K.; PRAKASH, M. A. S. Development of an efficient *in vitro* regeneration system in *Costus speciosus* – an important herbal insulin plant. *South African Journal of Botany*, v. 149, p. 468-475, 2022.

BIELACH, A.; PODLEŠÁKOVÁ, K.; MARHAVÝ, P.; DUCLERCQ, J.; CUESTA, C.; MÜLLER, B.; GRUNEWALD, W.; TARKOWSKI, P.; BENKOVÁ, E. Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. *The Plant Cell*, v. 24, n. 7, p. 3967-3981, 2012.

CANÇADO, G. M. A.; RIBEIRO, A. P.; FREITAS, G. F.; SÁ, M. E. L.; SILVA, H. E.; PASQUAL, M.; VAL, A. D. B.; NUNES, C. F. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 64-74, 2009.

CARVALHO, J. M. F. C. *Técnicas de micropropagação*. Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. (Documento, 64).

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Composição e riqueza florística do componente arbóreo da Floresta Atlântica submontana na região de Imbaú, Município de Silva Jardim, RJ. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, n. 3, p. 727-740, 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. *Fatores inerentes à micropropagação*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Documentos, 148).

CASTRO, C. E. F.; MOREIRA, S. R.; CASTRO, C. R. de; SOUZA, F. V. D.; LOGES, V.; GONÇALVES, C.; COSTA, M. A. P. C.; MOURA, L. F. Avaliação de espécies de Costaceae para uso ornamental. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 17, n. 1, p. 63–74, 2011.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CHEN, C. A.; CHANG, C. C.; WEI, N. V.; CHEN, C. H.; LEIN, Y. T.; LIN, H. E.; DAI, C. F.; WALLACE, C. C. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. *Zoological Studies*, v. 43, n. 4, p. 759–771, 2004.

COELHO, N.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Endemic plant species conservation: biotechnological approaches. *Plants*, v. 9, n. 3, p. 345, 2020.

DAVID, D.; CHUWAN, L. E.; GANSAU, J. A. Optimizing sucrose and BAP concentrations for *in vitro* microrhizome induction of *Zingiber officinale* Rosc. ‘Tambunan’. *Malaysian*

Applied Biology, v. 47, p. 47– 52, 2018.

DE SOUZA FERRARI, M. P.; DOS SANTOS QUEIROZ, M.; DE ANDRADE, M. M.; TRETTEL, J. R.; MAGALHÃES, H. M. Growth regulators affect the growth and biochemical activity of *Curcuma longa* plants grown in vitro. *Journal of Agricultural Science*, v. 11, p. 277–291, 2019.

DIN, A.; QADRI, Z. A.; RATHER, Z. A.; MIR, M. S.; MURTAZA, I.; KHAN, F. A.; NEELO, F. A. R.; WANI, M. A. In vitro sterilisation of different explants of chrysanthemum (*Dendranthemum morifolium* L.) cvs. “Candid” and “Flirt”. *Current Journal of Applied Science and Technology*, v. 31, p. 1–14, 2018.

EMBRAPA; RIBEIRO, J. M.; CANUTO, K. M.; VESCHI, J. L. A. Compostos clorados: aspectos gerais e sua utilização como agente sanitificantes na agricultura, micropropagação e pecuária. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2008.

FERNANDES, Edilson José. *Morfologia de Costus spiralis (Jacq.) Roscoe (Costaceae): uma espécie medicinal em Alta Floresta, Mato Grosso*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v. 18, n. 37, p. 366-375, 2021.

GAIDAMASHVILI, M.; KHURTSIDZE, E.; KUTCHAVA, T.; LAMBARDI, M.; BENELLI, C. Efficient protocol for improving the development of cryopreserved embryonic axes of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) by encapsulation-vitrification. *Plants*, v. 10, n. 2, p. 231, 2021.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183–260.

HANDÁ, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica*, v. 35, n. 1, p. 29–33, 2005.

INGRAM, P. R.; HOMER, N. Z. M.; SMITH, R. A.; PITT, A. R.; WILSON, C. G.; OLEJNIK, O.; SPICKETT, C. M. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 410, n. 1, p. 121–133, 2003.

JENA, S.; RAY, A.; SAHOO, A.; SAHOO, S.; DASH, B.; KAR, B.; NAYAK, S. Rapid plant regeneration in industrially important *Curcuma zedoaria* revealing genetic and biochemical fidelity of the regenerants. *3 Biotech*, v. 10, p. 17, 2020.

JIMENEZ, L.; BOSKO, Y.; SMALLS, S.; IGNAR, R.; ENGLISH, D. Molecular detection

and identification of *Aspergillus niger* contamination in cosmetic/pharmaceutical raw materials and finished products. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v. 7, n. 1, p. 39–46, 1999.

KUHLMANN, M.; VIEIRA, R.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. *Costus spiralis* (Cana-do-brejo). In: VIEIRA, R.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C., eds. *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2016.

KHAIRUDIN, N. A.; HAIDA, Z.; HAKIMAN, M. In vitro shoot and root induction of *Kaempferia parviflora* (Zingiberaceae) rhizome using 6-benzylaminopurine. *Journal of Tropical Plant Physiology*, v. 12, n. 2, p. 23–32, dez. 2020. DOI: 10.56999/jtpp.2020.12.2.8.

KUNENE, E. N.; OSENI, T. O.; WAHOME, P. K.; MASIRARAMBI, M. T.; MCCUBBIN, M. J.; DLAMINI, P. S.; SIHLONGONYANE, S. A.; ZWANE, M. G. Effects of plant growth regulators and explant type on the in vitro micropropagation of wild ginger (*Siphonochilus aethiopicus* (Schweif.) B.L. Burt.). *Advances in Medicinal Plant Research*, v. 6, p. 54–63, 2018.

LABROOY, C.; ABDULLAH, T. L.; STANSLAS, J. Influence of N6-benzyladenine and sucrose on in vitro direct regeneration and microrhizome induction of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker, an important ethnomedicinal herb of Asia. *Tropical Life Sciences Research*, v. 31, p. 123–139, 2020.

LARONE, D. H. *Medically important fungi: a guide to identification*. 4. ed. Washington: ASM Press, 2002. LAS-CASAS, F. Endemismo de aves. 2000.

LEAL, L.; BIONDI, D. Potencial ornamental de espécies nativas. *Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal*, v. 4, n. 8, p. 1–16, 2006.

LIAO, C.; DOILOM, M.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; MANAWASINGHE, I. S.; CHETHANA, K. W. T.; BALASURIYA, A.; THAKSHILA, S. A. D.; LUO, M.; MAPOOK, A.; HTET, Z. H.; KODALUGODAARACHCHI, V.; WIJEKON, N.; SAXENA, R. K.; SENANAYAKE, I. C.; KULARATHNAGE, N. D.; ALREFAEI, A. F.; DONG, W. Challenges and update on fungal endophytes: classification, definition, diversity, ecology, evolution and functions. *Fungal Diversity*, v. 131, p. 301–367, 2025. DOI: 10.1007/s13225-025-00550-5.

MAAS, P. J. M. Costoideae (Zingiberaceae). *Fl. Neotrop. Monogr.*, v. 8, p. 1–140, 1972.

MAJI, P.; GHOSH DHAR, D.; MISRA, P.; DHAR, P. *Costus speciosus* (Koen ex Retz.) Sm.: Situação atual e perspectivas industriais futuras. *Industrial Crops and Products*, v. 152, p. 112571, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112571.

MALABADI, R. B. In vitro propagation of spiral ginger (*Costus speciosus* (Koen.) Sm.). *Ind.*

J. Genet. Plant Breed., v. 62, p. 277–278, 2002.

MALABADI, R. B.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. Effect of triacontanol on the micropropagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. using rhizome thin sections. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, v. 41, p. 129–132, 2005.

MALIK, N.; SENGAR, R. S.; KUMAR, D.; SINGH, S. K.; YADAV, M. K.; KUMAR, M.; SINGH, G. Assessment of various sterilant on differential growth response in *Carica papaya*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 9, p. 3080–3087, 2020.

MALHOTRA, E. V.; KAMALPRIYA, M.; BANSAL, S.; MEENA, D. P. S.; AGRAWAL, A. Improved protocol for micropropagation of genetically uniform plants of commercially important cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, v. 57, p. 409–417, 2021.

MANISHA, T.; VISHAL, S.; GARIMA, K. In vitro production of disease free planting material of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)—a single step procedure. *Research Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 25–29, 2018.

MARAVILHA, L. F.; TITON, M.; CANGUÇU, V. S.; ROCHA, F. M.; OLIVEIRA, M. L. R. de. Enraizamento in vitro e aclimatização de plântulas de *Corymbia citriodora*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 43, e202102232, 2023.

MEHABOOB, V. M.; FAIZAL, K.; SHAMSUDHEEN, K. L.; RAJA, P.; THIAGU, G.; SHAJA HAN, A. Direct organogenesis and microrhizome production in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 8, p. 2880–2883, 2019.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Tapeinochilos ananassae*.
Disponível em:

<https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=292693>

MIRI, S. M. Micropropagation, callus induction and regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Open Agriculture*, v. 5, p. 75–84, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0008>.

MONFORT, L. E. F.; SOUZA, S. A.; SILVA, M. F.; LIMA, M. A. Propagação in vitro de *Lippia sidoides* Cham.: efeito do tipo de explante e concentrações de BAP. *Revista Ceres*, v. 59, n. 2, p. 191–197, 2012.

MOTAMEDI-MIRHOSSEINI, L.; MOHAMMADI-NEJAD, G.; GOLKAR, P.; BAHRAMI-NEJAD, A. Evaluation of Some Drought Resistance Criteria in *Cumin* (*Cuminum cyminum* L.) Landraces. *Advances in Environmental Biology*, v. 5, n. 8, p. 2369–2372, 2011

MOURA, L. F.; SILVA, M. F.; LIMA, M. A.; MONFORT, L. E. F.; SOUZA, S. A.

Multiplicação in vitro de clones de *Eucalyptus* spp. em resposta ao BAP. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 32, n. 71, p. 291–298, 2012.

NERY, F. C.; GOULART, V. L. A.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; SILVA, L. C.; PRUDENTE, D. O.; NERY, M. C.; ALMEIDA, E. F. A. Micropropagation and chemical composition of *Zingiber spectabile* callus. *Acta Horticulturae*, v. 1083, p. 197–204, 2015.

OLIVEIRA, L. M. de; PEREIRA, A. R.; SILVA, D. F.; NOGUEIRA, R. C. Propagação in vitro de plantas ornamentais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 17, n. 1, p. 73–82, 2011.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. B. L. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013.

PARK, H. Y.; KIM, K. S.; AK, G.; ZENGİN, G.; CZIÁKY, Z.; JEKŐ, J.; ADAIKALM, K.; SONG, K.; KIM, D. H.; SIVANESAN, I. Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker: phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities. *Plants*, v. 10, p. 698, 2021.

PENCE, V. C.; MEYER, A.; LINSKY, J.; GRATZFELD, J.; PRITCHARD, H. W.; WESTWOOD, M.; BRUNS, E. B. Defining exceptional species—A conceptual framework to expand and advance ex situ conservation of plant diversity beyond conventional seed banking. *Biological Conservation*, v. 266, p. 109440, 2022.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHE, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C. de; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 27, n. 2, p. 238–240, 2005.

PIRES, L. L. *Paisagismo e Plantas Ornamentais*. Goiana: Universidade Federal de Goiás, 2008. Apostila de Paisagismo – UFGO.

PORCIÚNCULA, L. M.; TEIXEIRA, A. R.; SANTOS, M. F. C.; D'OCA, M. G. M.; SANTOS, L. S.; NACHTIGALL, F. M.; ORTH, E. S.; D'OCA, C. R. M. Novel lipophilic analogues from 2,4-D and propanil herbicides: biological activity and kinetic studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 174, p. 104760, 2020. DOI: 10.1016/j.pestbp.2020.104760.

PORFÍRIO, J. C. Papel da auxina no desenvolvimento vegetal. Agrocere Binova, 2016.

PUNYARANI, K.; SHARMA, J. G. Micropropagation and microrhizome induction in *Costus pictus* D. Don using in vitro and ex vitro nodal segments as explant. *Notulae Scientiae Biologicae*, v. 4, n. 2, p. 72–78, 2012.

RAGHU, A. V.; PILLAI, G. S. Further research on clonal propagation of *Costus speciosus*.

Journal of Tropical Medicinal Plants, v. 7, p. 229–234, 2006.

RAMASUBRAMANIYAN, M. R.; RAJESH, K.; DHARISHINI, M. P.; KRISHNA MOORTHY, M.; RADHA, A.; BALASUBRAMANIAN, K.; SHRUTI, B. S.; NANDHINI, S. R. Studies on optimization of medium in induction and regeneration of callus and shoot from *Costus igneus* and its phytochemical profile. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, v. 4, n. 2, p. 75, 2015.

RAMÍREZ, S. R.; ROUBIK, D. W.; SKOV, C.; PIERCE, N. A. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 100, n. 3, p. 552–572, jun. 2010.

REIS, A.; FARIA, R. T. de; CAMPOSTRINI, E. Micropropagação de bananeira ‘Maçã’ (AAB) em função de diferentes concentrações de BAP e ANA. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 4, p. 1191–1196, 2008.

RIBEIRO, D. G.; RIBEIRO, D. C.; LOPES, S. C. Introdução à cultura de tecidos vegetais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq, 1999. p. 1–20

RODRIGUES, A. C. D.; DE ALBUQUERQUE, E. S. B.; DE MACÊDO VIEIRA, A. C. Plantas úteis da ordem Zingiberales utilizadas pelos agricultores de Magé – Rio de Janeiro. *Extensão Universitária em Farmacobotânica*, 2018.

RODPRADIT, S.; SONGNUN, K.; SHUSUWANARUK, K. In vitro microrhizome induction in *Hedychium stenopetalum* Lodd. In: ISHS Acta Horticulturae 1167: I International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals, p. 163–168, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1167.25>.

ROY, A.; PAL, A. Propagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. through in vitro rhizome production. *Plant Cell Reports*, v. 10, p. 525–528, 1991.

SALINAS, N. R.; CLAVIJO, L.; BETANCUR, J. C. Una nueva especie de *Costus* (Costaceae) de la Amazonia colombiana. *Caldasia*, v. 29, n. 2, p. 195–201, 2007.

SAHOO, S.; SINGH, S.; SAHOO, A.; SAHOO, B. C.; JENA, S.; KAR, B.; NAYAK, S. Molecular and phytochemical stability of longterm micropropagated greater galanga (*Alpinia galanga*) revealed suitable for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, v. 148, p. 112274, 2020. SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.). *Genética e Evolução Vegetal*. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 415–426.

SANTOS, M. L. dos; BERLITZ, D. L.; WIEST, S. L. F. Benefits associated with the interaction of endophytic bacteria and plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 61, e18160431, 2018. DOI: 10.1590/1678-4324-2018160431.

SARMA, I.; DEKA, A. C. Conservation of *Curcuma caesia* Roxb. – a critically endangered species via in vitro plant regeneration from organogenic callus. *Asian Journal of Conservation Biology*, v. 9, p. 151–155, 2020.

SCHEMSKE, D. W. Breeding system and habitat effects of fitness components in three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). *Evolution*, v. 37, p. 523–539, 1983.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDOERF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; CROUS, P. W.; BOEKHOUT, T.; DAMM, U.; DE HOOG, G. S.; EBERHARDT, U.; GROENEWALD, J. Z.; GROENEWALD, M.; HAGEN, F.; HOUBRAKEN, J.; QUAEDVLIEG, W.; STIELOW, B.; VU, T. D.; WALTHER, G. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1117018109.

SILVEIRA, F. A. O.; TEIXIDO, A. L.; ZANETTI, M.; PÁDUA, J. G.; ANDRADE, A. C. S.; COSTA, M. L. N. Ex situ conservation of threatened plants in Brazil: a strategic plan to achieve Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation. *Rodriguésia*, v. 69, n. 4, p. 1547–1555, 2018. DOI: 10.1590/2175- 7860201869405.

SINGH, W. R. C.; SINGH, H. B.; DEVI, S. S.; SINGH, W. N.; SINGH, N. M.; DEVI, Y. P. Conservation of *Curcuma caesia* by in vitro techniques. *Helix*, 3–4, p. 708–713, 2015.

SIQUEIRA, E. P.; BRAGA, A. C. S.; GALLIGANI, F.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; COTA, B. B. Saponinas dos rizomas de *Chamaecostus subsessilis* e sua atividade citotóxica contra células de leucemia promielocítica humana HL60. *Jornal de Pesquisa em Farmácia e Farmacognosia*, v. 8, n. 5, p. 466–474, 2020.

SKINNER, D. *Heliconia Society International Bulletin*, v. 18, p. 6, 2012 SKINNER, D. Custo ornamental. *Enfeite. Hórtico*, v. 22, p. 307–317, 2016.

SKINNER, L. F.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. Conservação in situ e ex situ da biodiversidade brasileira. *Diversidade e Gestão*, v. 2, n. 2, p. 47–51, 2018.

SOUZA JÚNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147–151, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado no APG IV*. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2019.

SPECHT, C. D. Gondwanan vicariance or dispersal in the tropics? The biogeographic history of the tropical monocot family Costaceae (Zingiberales). *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, v. 22, n. 1, p. 633–644, 2006.

SPECHT, C. D.; STEVENSON, D. W. A new phylogeny-based generic classification of Costaceae (Zingiberales). *Taxon*, v. 55, n. 1, p. 153–163, 2006.

STEVENS, P. F. *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since].

SUBRAMANIAN, M.; KOH, K. S.; GANTAIT, S. Advances on in vitro regeneration and microrhizome production in Zingiberaceae family. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 60, p. 601–619, 2024.

SUMON, M. N. R.; BANU, T. A.; MOLLIKA, S. R.; GOSWAMI, B.; ISLAM, M.; AKTER, S.; SHARMIN, R. A.; KHAN, M. S. In vitro regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Plant Tissue Cult. & Biotechnol.*, v. 29, p. 151–159, 2019.

SUN, X.; GUO, L.-D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, v. 3, n. 1, p. 65-76, 2012.

TAKAHASHI, E. K. Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TODD, O. E.; FIGUEIREDO, M. R. A.; MORRAN, S.; SONI, N.; PRESTON, C.; KUBEŠ, M. F.; NAPIER, R.; GAINES, T. A. Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. *Science*, v. 370, n. 6520, p. 1–3, 2020.

VOLK, G. M.; BONNART, R.; ARAÚJO DE OLIVEIRA, A. C.; HENK, A. D. Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation. *Applications in Plant Sciences*, v. 10, n. 5, e11489, 2022.

WANG, G.-L.; XIONG, F.; QUE, F.; WANG, F.; XU, Z.-S.; XIONG, A.-S. Morphological characteristics, anatomical structure, and gene expression: novel insights into gibberellin biosynthesis and perception during carrot growth and development. *Horticulture Research*, v. 2, p. 15028, 2015.

WANI, S. J.; KAGDI, I. A.; TAMBOLI, P. S.; NIRMALKAR, V. S.; PATIL, S. N.; SIDHU, A. K. Optimization of MS media for Callus and Suspension Culture of *Costus pictus*. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, v. 5, n. 2, p. 390–394, 2014.

WILLIAMS, N. H. The biology of orchids and euglossine bees. In: ARDITTI, J. (Ed.). *Orchid biology: reviews and perspectives*, II. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1982. p. 119–171.

WOCHOK, Z. S. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biological Conservation*, v. 20, p. 83–89, 1981.

ZUCCHI, R. S.; SAKAGAMI, F.; CAMARGO, J. M. F. Biological observations on a neotropical parasocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). A comparative study. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University Series VI, Zoology*, v. 17, p. 271–380, 1969.

ZAHID, N. A.; JAAFAR, H. Z. E.; HAKIMAN, M. Alterations in microrhizome induction, shoot multiplication and rooting of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) var. Bentong with regards to sucrose and plant growth regulators application. *Agronomy*, v. 11, p. 320, 2021.

ZURADA, A. R.; IZZATI, K. F. L.; NAZREENA, O. A.; OMAR, N. In vitro microrhizome formation in *Kaempferia parviflora*. *Annual Research & Review in Biology*, v. 5, p. 460–467, 2015.

PROTÓCOLOS INICIAIS PARA CULTURA *IN VITRO* DE
CHAMAECOSTUS SUBSESSILIS VISANDO MICROPROPAGAÇÃO E
CONSERVAÇÃO *EX SITU*

PROTOCOLOS INICIAIS PARA CULTURA *IN VITRO* DE *CHAMAECOSTUS SUBSESSILIS* VISANDO MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU*

RESUMO

Chamaecostus subsessilis (Costaceae) é uma espécie endêmica da América do Sul, cuja redução populacional demanda estratégias de conservação *ex situ*. Este estudo avaliou estratégias de introdução *in vitro* a partir de explantes foliares como etapa habilitadora à micropropagação. Testaram-se: pré-pulverização com Cercobin® 1% por 7 ou 10 dias; desinfestação sequencial (álcool 70%, NaClO 0,2–0,5% e HgCl₂ 0–0,05%); imersões em Cercobin® 0,2% (2, 5 e 10 h); antimicrobianos (meio MS com/sem ampicilina 500 mg L⁻¹; e, em ensaios separados, espectinomicina 150 mg L⁻¹); H₂O₂ 3–12% por 10–20 min; Dioxiplus®; além de meios MS suplementados, conforme o ensaio, com BAP/cinetina no experimento 4 e 2,4-D e PVP nos experimentos 5, 6 e 7. Os explantes foram mantidos a 23 °C, no escuro, e avaliados quanto à contaminação fúngica/bacteriana e oxidação; possíveis contaminantes foram analisadas anatomicamente; contaminantes foram isolados em BDA e submetidos à extração de DNA (CTAB 1% ou 3%) visando PCR-ITS. No experimento inicial, a contaminação fúngica foi de 100%. A pré-pulverização por 10 dias reduziu a contaminação no curto prazo (7º dia), mas houve recrudescimento aos 30 dias. H₂O₂ e Dioxiplus® não reduziram a contaminação nas condições testadas; ampicilina exibiu efeito limitado e, com espectinomicina, a contaminação persistiu. A oxidação foi frequente (até 79%). A extração/quantificação indicou DNA insuficiente e/ou com pureza aquém do ideal para identificação molecular por PCR-ITS (a despeito de melhor integridade pontual com CTAB 3%). Conclui-se que a falta de sucesso no estabelecimento decorreu de contaminação recorrente (provavelmente endofítica) e oxidação. Recomenda-se: (i) recalibrar a assepsia (pré-pulverização mais longa e ajuste de dose/tempo de esterilizantes), (ii) selecionar antibióticos/fungicidas com base em suscetibilidade local, e (iii) aperfeiçoar a extração/purificação de DNA para viabilizar a identificação dos contaminantes antes de avançar para etapas morfogênicas.

Palavras-chaves: *Chamaecostus subsessilis*, Contaminação endofítica, Assepsia, Oxidante, Antibiótico, Cultura *in vitro*.

INITIAL PROTOCOLS FOR *IN VITRO* CULTURE OF *CHAMAECOSTUS SUBSESSILIS* AIMING AT MICROPROPAGATION AND *EX SITU* CONSERVATION

ABSTRACT

Chamaecostus subsessilis (Costaceae) is an endemic species of South America whose population decline requires ex situ conservation strategies. This study evaluated in vitro introduction strategies using leaf explants as an enabling step for micropropagation. The following treatments were tested: pre-spraying with Cercobin® 1% for 7 or 10 days; sequential disinfestation (70% ethanol, NaClO 0.2–0.5%, and HgCl₂ 0–0.05%); immersion in Cercobin® 0.2% (2, 5, and 10 h); antimicrobials (MS medium with/without ampicillin 500 mg L⁻¹; and, in separate assays, spectinomycin 150 mg L⁻¹); H₂O₂ 3–12% for 10–20 min; Dioxiplus®; in addition to MS media supplemented, depending on the assay, with BAP/kinetin or 2,4-D and PVP. Explants were maintained at 23 °C, in the dark, and evaluated for fungal/bacterial contamination and oxidation; suspicious structures were analyzed anatomically; contaminants were isolated in PDA and subjected to DNA extraction (CTAB 1% or 3%) for ITS-PCR. In the initial experiment, fungal contamination reached 100%. Pre-spraying for 10 days reduced contamination in the short term (7th day), but resurgence occurred at 30 days. H₂O₂ and Dioxiplus® did not reduce contamination under the tested conditions; ampicillin showed limited effect and, with spectinomycin, contamination persisted. Oxidation was frequent (up to 79%). DNA extraction/quantification indicated insufficient yield and/or purity below the ideal threshold for molecular identification by ITS-PCR (despite better point integrity with CTAB 3%). It is concluded that failure in culture establishment resulted from recurrent contamination (likely endophytic) and oxidation. Recommendations include: (i) recalibrating asepsis (longer pre-spraying and adjustment of sterilant dose/time), (ii) selecting antibiotics/fungicides based on local susceptibility, and (iii) improving DNA extraction/purification to enable contaminant identification prior to advancing to morphogenic stages.

Keywords: *Chamaecostus subsessilis*, Endophytic contamination, Asepsis, Oxidant, Antibiotic, *in vitro* culture

1. INTRODUÇÃO

Chamaecostus é um grupo de plantas de pequeno porte, podendo inclusive surgir sob a forma de rosetas com caules subterrâneos reduzidos, geralmente não ultrapassando 1 metro de altura e apresentando caules com menos de 1 centímetro de diâmetro (André et al., 2015).

Segundo Specht e Stevenson (2006), as principais características compartilhadas (sinapomorfias) que permitem reconhecer o gênero incluem: tamanho reduzido; estigma em formato de cálice; labelo exposto; e presença de pontuações em tons vermelho-acastanhados no ovário e no tubo do labelo. Destacam-se ainda os brotos delicados e os nós frequentemente arroxeados e levemente dobrados. Outro traço comum é a produção esporádica de brotos aéreos durante o período seco, assim como a presença de estruturas subterrâneas de reserva, como tubérculos. O labelo é de grandes dimensões, com ápice oval, podendo apresentar coloração amarela, laranja, vermelha ou branca. A ocorrência de *Chamaecostus* limita-se ao território sul-americano, abrangendo desde o Escudo das Guianas até as planícies amazônicas da Bolívia e do Brasil, passando pela borda ocidental do escudo brasileiro e alcançando a Mata Atlântica (Fig. 2).

Além disso, essas espécies tendem a ocorrer de forma agrupada, com alta densidade local, mas distribuição naturalmente esparsa na paisagem. Atualmente, o gênero é composto por sete espécies descritas, todas restritas à América do Sul. Sua distribuição abrange desde florestas secas sazonais no sudoeste da Amazônia até os ecossistemas de Cerrado no Brasil Central (André et al., 2015).

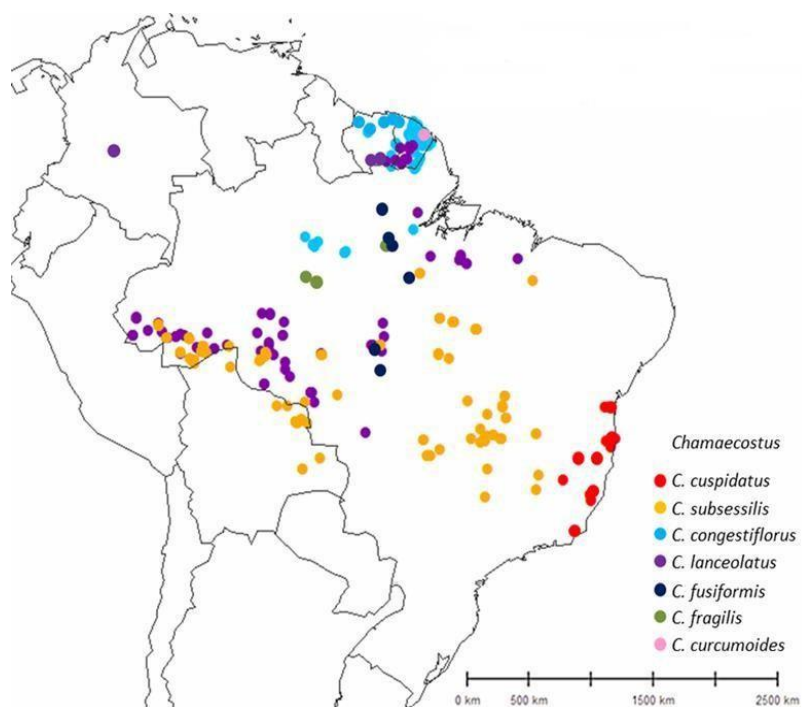


Figura 2. Distribuição geográfica das espécies de *Chamaecostus* na América do Sul. Os pontos coloridos

representam registros de ocorrência de cada espécie: vermelho – *C. cuspidatus*; amarelo – *C. subsessilis*; azul claro – *C. congestiflorus*; roxo – *C. lanceolatus*; azul escuro – *C. fusiformis*; verde – *C. fragilis*; rosa – *C. curcumoides*. A escala indica distâncias em quilômetros. Imagem de T. Andre.

A micropropagação é uma abordagem em biotecnologia que explora o potencial de diferentes partes da planta para originar novas plântulas vigorosas, livres de contaminação, quando cultivadas em ambiente controlado, com condições assépticas e em meio nutritivo específico. Em condições ideais, é possível obter, em curto prazo tempo, grande quantidade de mudas com baixo risco sanitário, desde que o protocolo de estabelecimento seja eficaz (Kumar e Reddy, 2011). Vários trabalhos científicos empregaram gemas de rizoma como explantes, por exemplo, em *Curcuma longa*, para indução e multiplicação *in vitro* (Rahman et al., 2004; Tyagi et al., 2004; Tyagi et al., 2007; Das et al., 2010; Soundar Raju et al., 2015; Yee et al., 2019). Entretanto, gemas de rizoma são particularmente suscetíveis à contaminação por patógenos de solo, e a taxa de regeneração utilizando métodos vegetativos convencionais é bastante limitada. Essas limitações justificam a seleção criteriosa do tipo de explante e do esquema de assepsia. Nesse contexto, explantes foliares constituem alternativa vantajosa, pois mitigam o risco de contaminação associado a estruturas subterrâneas e favorecem a padronização da assepsia, além de facilitar a avaliação de estratégias de desinfestação e de condições iniciais em material oriundo de campo.

A micropropagação é estratégica para conservação *ex situ* e produção clonal de material de qualidade, mas seu gargalo recorrente é o estabelecimento asséptico dos explantes. Relatos de diferentes culturas indicam que contaminação microbiana (externa e, principalmente, endofítica) e escurecimento/oxidação estão entre as causas mais frequentes de insucesso, exigindo desenho criterioso do protocolo inicial (escolha de explante, pré-tratamento do material doador, sequência de desinfestação, aditivos no meio, regime de luz/temperatura). Revisões recentes sistematizam esses entraves e as soluções técnicas usuais (ajuste fino de desinfestantes, controle do escurecimento, tempo de subcultivo, manejo de recalitrância), destacando que não há “receita única” e que protocolos precisam ser espécie-específicos (Abdalla et al., 2022; Volk et al., 2022).

Normalmente, utilizam-se explantes com comprimento entre 1 e 1,5 cm. Explantes menores têm menor risco de transmitir contaminantes, porém são mais suscetíveis a danos durante os processos de lavagem, esterilização e manuseio. Por outro lado, explantes maiores apresentam maior dificuldade de limpeza eficaz (George et al., 1996). Dessa forma, é essencial escolher explantes com tamanho adequado, que suportem bem as etapas de preparo e apresentem menor tendência à transmissão de doenças.

No plano químico-higiênico, a desinfestação sequencial com etanol e hipoclorito de sódio (NaClO) é a base mais difundida; quando ineficiente diante de biofilmes ou endófitos,

protocolos empregam cloreto de mercúrio (HgCl_2), que pode reduzir drasticamente a contaminação, porém é altamente tóxico para humanos e tecidos vegetais, demandando uso cauteloso, tempos curtos e avaliação de fitotoxicidade. Trabalhos aplicados reforçam a eficácia do HgCl_2 em certos explantes, mas também documentam necrose e perdas quando concentrações/tempos são elevadas, recomendando a comparação com alternativas (p. ex., NaClO otimizado, “plant preservative mixture”, ou agentes/ozônio quando cabível) (Samiei et al. 2017; Poobathy et al., 2019; Kumar et al., 2021; Gu et al., 2022).

As técnicas moleculares, em particular a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes, consolidaram-se como o método de referência para o diagnóstico de doenças em plantas, devido à elevada sensibilidade, especificidade e versatilidade que apresentam. Por meio da PCR, é possível amplificar sequências específicas de DNA ou RNA do patógeno, possibilitando sua detecção precisa e a caracterização detalhada dos agentes causadores em uma escala e resolução inéditas (Prasanna et al., 2024).

Até onde alcança a literatura indexada consultada, não há registros de protocolos de estabelecimento *in vitro* e micropropagação para *Chamaecostus subsessilis*, o que evidencia uma lacuna aplicada para conservação e uso ornamental da espécie. Diante disso, este estudo tem como objetivo geral viabilizar o estabelecimento *in vitro* a partir de explantes foliares, reduzindo contaminação e oxidação como etapa habilitadora para futuras rotas de micropropagação e conservação *ex situ*. Ao atacar o gargalo do estabelecimento asséptico, o trabalho pretende gerar evidências para o redesenho de protocolos e subsidiar, em etapas subsequentes, a micropropagação e a conservação *ex situ* de *C. subsessilis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições gerais (material vegetal, assepsia e cultivo)

Foram utilizados explantes foliares de *C. subsessilis* provenientes de plantas de uma população nativa do Centro-Oeste (Fercal, DF; 15°30'43.98" S; 47°57'50.68" W). As plantas coletadas foram transplantadas para vasos e mantidas em casa de vegetação do CRAD/UnB, com irrigação automática duas vezes ao dia (manhã e fim de tarde). As folhas foram cortadas na base foliar, lavadas com sabão neutro e água corrente, e mantidas hidratadas durante 5 minutos até a assepsia. Todas as etapas subsequentes ocorreram em câmara de fluxo laminar. A desinfestação seguiu a sequência álcool 70% (v/v) → hipoclorito de sódio (NaClO) → cloreto de mercúrio (HgCl_2), com 4 min por etapa, sob agitação, seguida de duas lavagens em água destilada autoclavada, as concentrações de NaClO e HgCl_2 variaram conforme cada experimento, descrito adiante, (Figura 3).

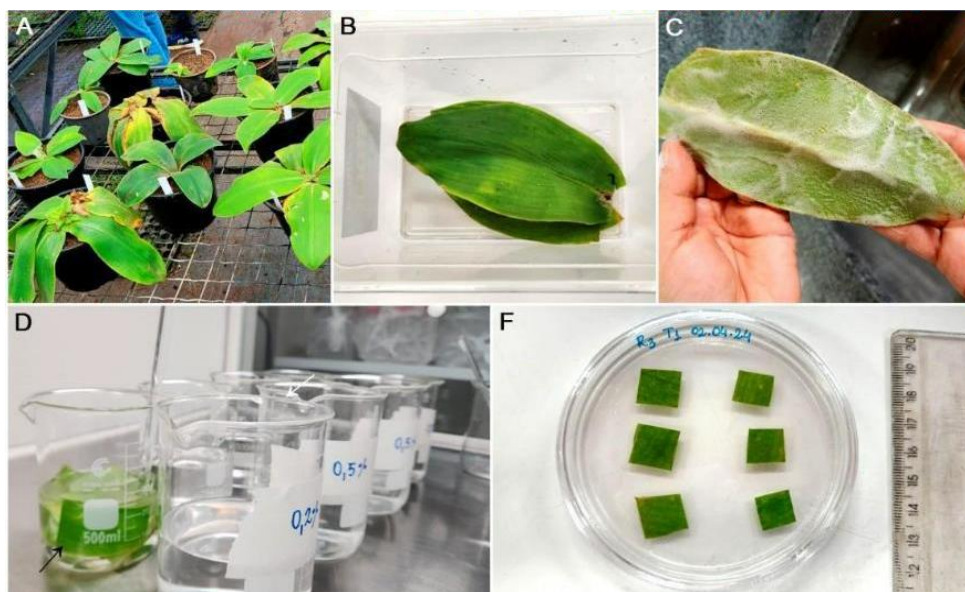


Figura 3. Assepsia de explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* para estabelecimento *in vitro*. **(A)** Plantas mantidas em casa de vegetação do CRAD/UnB. **(B)** Folhas recém-coletadas. **(C)** Higienização em água e sabão neutro. **(D)** Explantes foliares submetidos aos diferentes tratamentos de assepsia no fluxo laminar. **(E)** Fragmentos (1 cm²) inoculados em placas de Petri com meio MS.

Fragmentos foliares de aproximadamente 1 cm² foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio (Figura 3), em placas de Petri 15 × 90 mm contendo cerca de 25 mL de MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de *myo*-inositol e 0,05 g L⁻¹ de vitaminas MS (Sigma®) solução estoque-. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1. Os meios foram autoclavados a 121 °C/20 min/1,5 atm. As culturas foram mantidas a cerca de 23 °C, no escuro, em sala de crescimento, visando reduzir escurecimento/oxidação inicial. Em todos os ensaios registrou-se os percentuais de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e oxidação/escurecimento dos explantes. O delineamento foi inteiramente casualizado; o número de repetições, fatores e tempos de avaliação variaram conforme cada experimento. Os dados foram submetidos à ANOVA, e as médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$). Médias e erros-padrões foram organizados no Microsoft Excel®.

2.2 Descrição dos experimentos (apenas variações em relação ao item 2.1)

Tabela 2. Síntese do delineamento dos sete experimentos de estabelecimento/assepsia em *Chamaecostus subsessilis*

Experimento	Fator principal	Níveis/condições	Aditivos no meio	Repetições (explantos/rep.)	Avaliações	Referência
1	NaClO / HgCl ₂	NaClO 0,2–0,5%; HgCl ₂ 0–0,05% (T4 sem HgCl ₂)	— (MS padrão)	6 (6)	6 dias	Bharathi et al. (2022), modificado
2	Cercobin® (imersão)	0,2% por 2, 5 ou 10 h	— (MS padrão)	6 (6)	6 dias	Bharathi et al. (2022), modificado
3	Cercobin® + ampicilina	Imersão 0,2% (2–10 h) + meio com/sem ampicilina (500 mg L ⁻¹)	± ampicilina	3 (6)	7 e 30 dias	Bharathi et al. (2022), modificado
4	Cercobin® (pulverização)	1% por 7 d (T1) ou 10 d (T2), 3×/dia	espectinomicina (150 mg) + BAP 2 + Cin 2 mg L ⁻¹	13 (6)	7 e 30 dias	Bharathi et al. (2022), modificado
5	H ₂ O ₂ (imersão)	3–12% por 10 ou 20 min (sem Dioxiplus®)	espectinomicina (150 mg) + 2,4-D 1 + PVP 0,5 mg L ⁻¹	6 (6)	21 dias	Bharathi et al. (2022), modificado
6	H ₂ O ₂ + Dioxiplus®	3–12% por 10 ou 20 min + Dioxiplus® 2 mL L ⁻¹	idem Exp. 5 + Dioxiplus®	3 (6)	21 dias	Bharathi et al. (2022) e Rocha et al. (2024) modificado
7	Dioxiplus®	sem H ₂ O ₂ ; Dioxiplus® 2 mL L ⁻¹	espectinomicina (150 mg) + 2,4-D 1 + PVP 0,5 mg L ⁻¹ + Dioxiplus®	10 (6)	21 dias	Bharathi et al. (2022) e Rocha et al. (2024) modificado

Abreviações: MS = Murashige e Skoog (1962); NaClO = hipoclorito de sódio; HgCl₂ = cloreto de mercúrio; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; Dioxiplus® = dióxido de cloro (ClO₂) adicionado por filtração estéril; BAP = 6-benzilaminopurina; Cin = cinetina; 2,4-D = ácido 2,4- diclorofenoxiacético; PVP = polivinilpirrolidona. Nota: onde aparece “—” no quadro significa “igual ao protocolo geral (item 2.1). T4 sem HgCl₂ indica o controle desse fator no Experimento 1. O símbolo ± ampicilina (Exp. 3) denota presença/ausência de ampicilina (500 mg L⁻¹) no meio. No Exp. 4, a pulverização com Cercobin® 1% foi aplicada 3×/dia por 7 dias (T1) ou 10 dias (T2) em casa de vegetação. Nos Exp. 5–6, os explantes foram imersos em H₂O₂ (3–12%) por 10 ou 20 min; no Exp. 6 o meio recebeu Dioxiplus® 2 mL L⁻¹; no Exp. 7, apenas Dioxiplus® foi adicionado ao meio (sem H₂O₂).

O fluxo operacional dos experimentos com pré-pulverização (Exp. 4–7) está resumido na Figura 3.

Experimento 1 — NaClO/HgCl₂. A sequência de desinfestação incluiu álcool 70% (fixo), seguida de NaClO entre 0,2–0,5% e HgCl₂ entre 0–0,05%; no T4 o HgCl₂ foi omitido (controle desse fator). O meio foi MS padrão, sem aditivos específicos. O delineamento teve 6 repetições por tratamento, com 6 explantes por repetição. As avaliações ocorreram 6 dias após a inoculação, seguindo o protocolo de Bharathi et al. (2022), com algumas modificações.

Experimento 2 — Cercobin® (imersão). Os explantes foram imersos em Cercobin® 0,2% por 2, 5 ou 10 horas e cultivados em MS padrão (sem aditivos do tratamento). O delineamento contou com 6 repetições por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 6 dias, seguindo o protocolo de Bharathi et al. (2022), com algumas modificações.

Experimento 3 — Cercobin® (imersão) ± ampicilina. Após imersão em Cercobin® 0,2% (2, 5 ou 10 h), os explantes foram cultivados em meio MS com ou sem ampicilina (500 mg L⁻¹). O delineamento teve 3 repetições por tratamento. As avaliações ocorreram aos 7 e 30 dias, Segundo o protocolo de Bharathi et al. (2022), com determinadas modificações.

Experimento 4 — Cercobin® (pulverização). As plantas-matrizes receberam pulverização de Cercobin® 1% (etapa B e C da Fig.4) No Tratamento 1 (7 dias), as pulverizações foram realizadas uma única vez ao dia, no período da manhã, durante os quatro primeiros dias. Nos dois dias subsequentes, as aplicações ocorreram em dois períodos (manhã e tarde) e, no último dia, em três períodos distintos (manhã, tarde e noite). No Tratamento 2 (10 dias), a pulverização foi conduzida exclusivamente no período da manhã ao longo dos sete primeiros dias, passando a ser realizada em dois períodos (manhã e tarde) nos dois dias seguintes e, no último dia, em três períodos (manhã, tarde e noite). Ressalta-se que os horários de aplicação foram previamente fixados em 7h (manhã), 12h (tarde) e 17h (noite) (Tabela 1, anexo 1). Os explantes foram cultivados em MS suplementado com espectinomicina (150 mg), BAP 2 mg L⁻¹ e cinetina 2 mg L⁻¹. O delineamento incluiu 13 repetições por tratamento, com 6 explantes por repetição. As avaliações foram feitas aos 7 e 30 dias, conforme o protocolo proposto por Bharathi et al. (2022), com algumas alterações.

Nos três últimos experimentos (5, 6 e 7), as plantas foram pulverizadas na casa de vegetação, seguindo o mesmo regime estabelecido no Tratamento 2 do Experimento 4 (etapa B e C da Fig. 4).

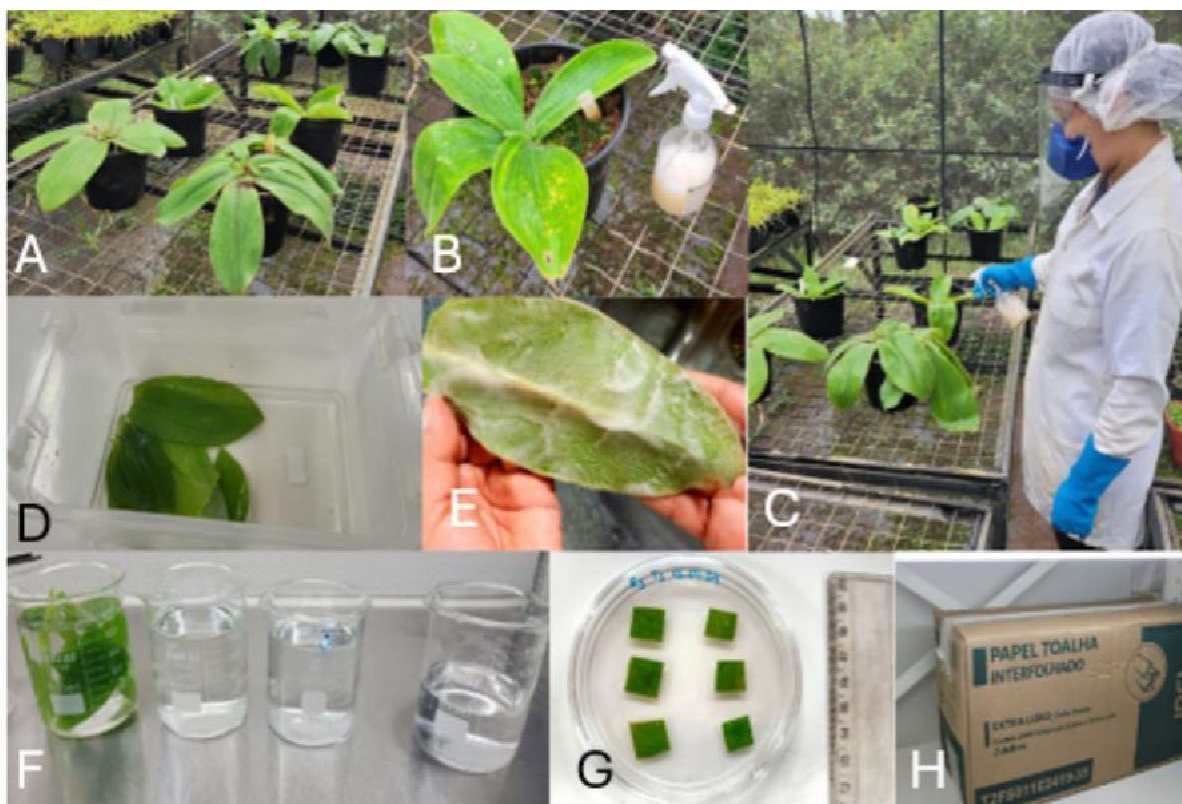


Figura 4. Fluxo experimental dos ensaios com pré-pulverização. **(A)** Plantas em casa de vegetação sob dois regimes de pré-pulverização. **(B–C)** Aplicação de Cercobin® 1% (3×/dia). **(D)** Coleta das folhas. **(E)** Lavagem com detergente neutro. **(F)** Etapas sequenciais de assepsia no fluxo laminar (álcool 70% → NaClO → HgCl₂). **(G)** Explantes foliares (cerca de 1 cm²) inoculados com a face abaxial em contato com o meio MS. **(H)** Incubação das placas a aproximadamente 23 °C no escuro dentro de caixa de papelão.

Experimento 5 — H₂O₂ (imersão). Os explantes foram imersos em H₂O₂ P.A. entre 3–12% por 10 ou 20 minutos (sem Dioxiplus®) e cultivados em MS contendo espectinomicina (150 mg), 2,4-D 1 mg L⁻¹ e PVP 0,5 mg L⁻¹ (etapas D–H da Fig. 4). O delineamento foi de 6 repetições por tratamento, com 6 explantes por repetição. As avaliações ocorreram aos 21 dias, baseado no protocolo de Bharathi et al. (2022), com modificações específicas.

Experimento 6 — H₂O₂ (imersão) + Dioxiplus® filtrado com filtro esterilizante de seringa (0,22 µm). O esquema de imersão em H₂O₂ (3–12%, 10 ou 20 min) foi mantido e o meio recebeu, além dos aditivos do Exp. 5, Dioxiplus® 2 mL L⁻¹ (etapas D–H da Fig. 4). O delineamento teve 3 repetições por tratamento, com 6 explantes por repetição. As avaliações foram realizadas aos 21 dias, seguindo os protocolos de Bharathi et al. (2022) e Rocha et al. (2024), com algumas modificações.

Experimento 7 — Dioxiplus®, filtrado com filtro esterilizante de seringa (0,22 µm) no meio. Sem imersão em H₂O₂; os explantes foram cultivados em MS suplementado com espectinomicina (150 mg), 2,4-D 1 mg L⁻¹, PVP 0,5 mg L⁻¹ e Dioxiplus® 2 mL L⁻¹. O fluxo

segue as etapas D–H da Fig. 4. O delineamento foi de 10 repetições por tratamento, com 6 explantes por repetição. As avaliações ocorreram aos 21 dias, seguindo os protocolos de Bharathi et al. (2022) e Rocha et al. (2024), com algumas modificações.

2.3 Inoculação dos fungos em meio BDA(Batata-Dextrose-Agar)

Visando à identificação dos fungos, cuja inoculação foi realizada apenas no Experimento 3, estes foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar), preparado pela dissolução do pó desidratado em água destilada/deionizada e autoclavado a 121 °C por 20 min (1,5 atm).

Após esse processo, o meio foi resfriado e distribuído em placas de Petri estéreis, em fluxo laminar, até solidificar. Os discos de miceliais (5-8 mm) foram posicionados equidistantes (cerca de 120°) na superfície do BDA, utilizando canudos/palitos estéreis. É essencial assegurar que o meio esteja isento de contaminações antes da inoculação das amostras. As placas foram seladas com filme plástico (Parafilm®) e incubadas invertidas em sala de crescimento, a 23 °C (± 1 °C), com fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de escuro (Fig. 5).

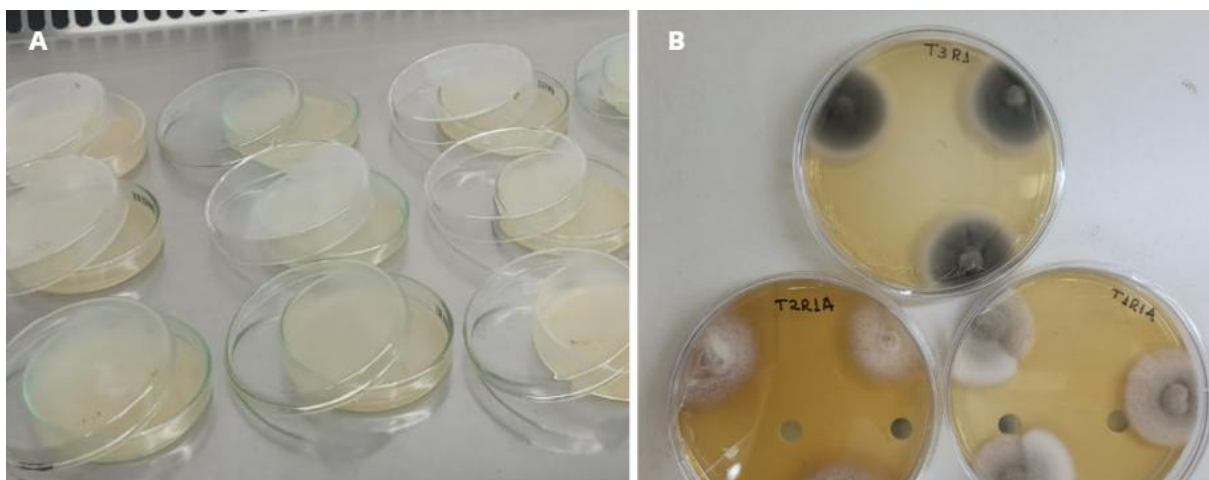


Figura 5. (A) Placas contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) esterilizado e manipuladas sob condições assépticas dentro do fluxo laminar; (B) Fungos em crescimento em meio BDA após incubação a 23 °C, 16 h/8 h (luz/escuro), placas seladas e invertida

2.4 Extração de DNA dos fungos

Para a extração de DNA de fungos a metodologia foi baseado no trabalho de Li, et. al. (2020) com modificações, sendo fundamental que os isolados sejam cultivados em meio apropriado por um período máximo de 7 dias pois durante esse intervalo, os fungos apresentam alta atividade metabólica, o que contribui para a manutenção da integridade do DNA, reduzindo a ocorrência de danos oxidativos ou degradação celular. Esse manejo adequado facilita o processo de extração e assegura a qualidade do DNA obtido, fundamental para análises posteriores (Fig. 5).

A extração de DNA é uma ferramenta indispensável para a identificação precisa de fungos, sendo fundamental para estudos taxonômicos, análises genéticas e o desenvolvimento de estratégias de controle microbiológico. Para realizar a extração, os micélios foram cuidadosamente raspados com o auxílio de uma lâmina de gilete esterilizada, garantindo a integridade do material genético e minimizando o risco de contaminação.

O material raspado foi transferido para tubos Eppendorf de 2 mL e, posteriormente, foi adicionado solução de cetiltrimetilamônio brometo (CTAB), contendo CTAB 3% e 1%, cloreto de sódio (NaCl) 1,4 M, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, Tris-HCl 100 mM e PVP 1%.

No total, foram avaliadas nove amostras, sendo identificados nove tipos de fungos. A amostra T1R3A foi submetida à análise em duas condições distintas: utilizando CTAB nas concentrações de 3% (3x) e 1% (1x). Para as demais amostras, foi empregada exclusivamente a solução de CTAB na concentração de 1% (Tab. 3, anexo 2).

Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos para homogeneização dos componentes e, em seguida, submetidos ao macerador por dois ciclos de 90 segundos. Posteriormente, foram incubados em banho seco a 65 °C, a 900 rpm, por 30 minutos. Após o aquecimento, os tubos permaneceram em repouso por aproximadamente 5 minutos. Na etapa seguinte, adicionaram-se 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA, 24:1), com nova agitação em vórtex por 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a

16.500 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. Após a centrifugação, aproximadamente 700 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos previamente identificados, aos quais foram adicionados 700 µL de isopropanol. Os tubos foram armazenados em freezer a -20 °C por 24 horas. Após esse período, os tubos foram agitados para homogeneização e submetidos à centrifugação a 16.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e verificou-se a formação do pellet. Em seguida, foram adicionados 400 µL de álcool 70%, e os tubos foram centrifugados a 16.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, e os *pellets* foram deixados para secagem completa. Por fim, 55 µL de água Milli-Q estéril foram adicionados a cada tubo para a ressuspensão dos *pellets*. Os tubos foram armazenados em freezer a -20 °C até o momento da utilização.

A quantidade e a qualidade do DNA extraídos foram verificados por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) a A260 nm e a amostra foi ajustada a uma concentração final de 2 ng/ µL para posteriores análises (Fig. 6).



Figura 6. Equipamento de NanoDrop usado para análise das concentrações de DNA nas amostras dos fungos.

A qualidade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado com 50 mL de solução de Tris/Borato/ EDTA (TBE). Para cada amostra, foram adicionados 2 μ L de tampão, 2 μ L de DNA e 2 μ L de Gel Red em cada poço do gel. A eletroforese foi realizada sob condições de 70 V e 300 mA por 45 minutos. Após a corrida, o gel foi transferido para o transiluminador UV para visualização dos fragmentos de DNA.

2.5 Amplificação do DNA (PCR) da região ITS-rDNA

Visando amplificar o DNA dos fungos, foram utilizados *primers* direcionados à região ITS-rDNA (Região Interna Transcrita do Espaçador do DNA Ribossomal), conforme descrito na (Tab. 4, anexo 3). As reações de PCR foram preparadas com tampão 10X, $MgCl_2$ (50 mM), dNTPs (10 mM, cada), Taq DNA Polimerase (5 U/ μ L), *primers* e 1 μ L de DNA. O volume final das reações foi ajustado para 50 μ L com água Milli-Q autoclavada (Tab.5, anexo 4). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (Proflex PCR System), adotando-se as seguintes condições para amplificação da região ITS. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 3 minutos, com o objetivo de desnaturar o DNA molde e separar suas fitas complementares. Em seguida, foram realizados 35 ciclos de amplificação, com as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, para desnaturar novamente o DNA e separar as fitas; anelamento a 51°C por 20 segundos, permitindo a ligação dos *primers* às regiões complementares do DNA molde; e extensão a 72°C por 1 minuto, durante o qual a Taq polimerase sintetizou novas cadeias de DNA a partir dos *primers*. Após os 35 ciclos, uma extensão final foi realizada a 72°C por 8 minutos, para garantir a completa extensão de qualquer fragmento de DNA parcialmente sintetizado. Ao final da amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador e, em seguida, transferidas para uma caixa com gelo para a extração do DNA.

A qualidade do DNA foi avaliada visualmente por eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado com 1 g de agarose dissolvida em 50 mL de solução de TBE 0,5%. A mistura foi homogeneizada no micro-ondas e vertida na cuba de eletroforese. Em cada poço do gel, foram adicionados 2 µL do tampão, 2 µL do DNA (*amplicon*) e 2 µL de GelRed. A eletroforese foi conduzida com parâmetros de 70 V e 300 mA por 45 minutos. Após a corrida, o gel foi transferido para o transiluminador UV para visualização dos fragmentos de DNA. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C para eventual sequenciamento futuro.

2.6 Aplicação da historesina na caracterização estrutural de tecidos vegetais de *Chamaecostus subsessilis*

As amostras foram inicialmente fixadas em F.A.A. 50% (Formaldeído, Ácido acético glacial e Álcool 50%) por 12 horas. Em seguida, foram transferidas para etanol 50% (2 h), 70% (2 h), 90% (2 h) e, por fim, 100% (2 h) para desidratação. No processo de pré-infiltração e infiltração das amostras, foi utilizado o kit Historesin® (Leica). No pré-infiltração, as amostras permaneceram por 2 horas em uma solução de etanol absoluto: resina líquida, na proporção 1:1. Para a infiltração, foram transferidas para 50 mL de resina líquida acrescida de 0,5 g de pó ativador (Meio A), permanecendo por 24 horas. Em seguida, as amostras foram dispostas em moldes de silicone, na orientação transversal, utilizando-se o Meio B (15 mL do Meio A + 1 mL de *Hardener*), para polimerização. Posteriormente, os moldes foram mantidos em estufa a 40°C até completa polimerização.

Os blocos contendo as amostras foram fixados em cubos de madeira (2×1 cm) com auxílio de adesivo instantâneo (Super Bonder®). Os cortes histológicos foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM 2145, com espessura de 8 µm, corados com Azul de Toluidina e montados em lâminas permanentes utilizando resina sintética ERV-MOUNT. As lâminas foram recobertas com laminulas, deixadas para secagem e, posteriormente, analisadas em fotomicroscópio Olympus BX 40 utilizando o software Image Pro Plus 6.0 (Fig. 7).

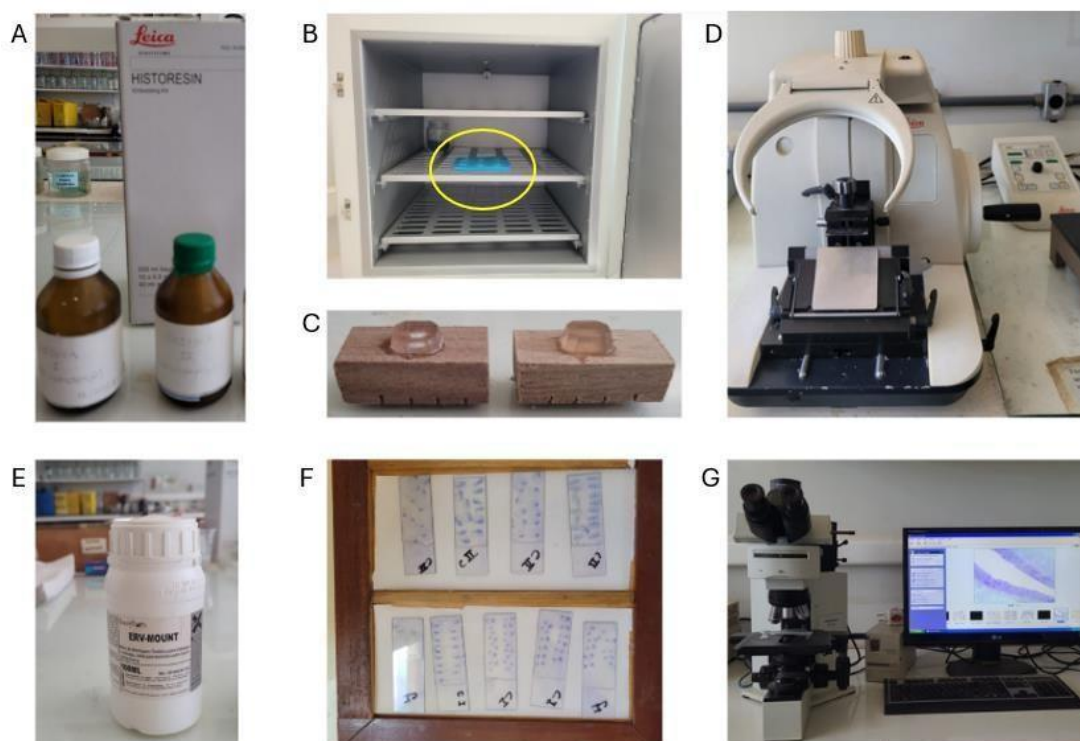


Figura 7. Processo de inclusão das amostras Historesina. **(A)** Material de inclusão (pré-infiltração e infiltração da Leica. **(B)** Material em moldes de silicone dentro da estufa. **(C)** Cubos de madeira com as amostras. **(D)** Micrótomo rotativo. **(E)** Resina utilizada para selar os cortes. **(F)** Cortes anatômicos de explante de *Chamaecostus subsessilis*. **(G)** Visualização dos cortes em Fotomicroscópio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimentos de assepsia

No Experimento 1, todos os tratamentos baseados em assepsia superficial (álcool 70 % → NaClO 0,2-0,5 % → HgCl₂ 0-0,05 %) resultaram em 100 % de contaminação fúngica (Fig. 8). Esse resultado, embora não ideal, está de acordo com vários trabalhos recentes que demonstram que endofíticos, microrganismos que vivem nos tecidos internos das plantas, representam uma barreira significativa para o estabelecimento de culturas *in vitro*. Esses organismos muitas vezes não são removidos por descontaminação que atua apenas na superfície (Reed e Tanprasert, 1995; Bamba et al., 2021; Volk et al., 2022; Şekerli, 2024; Anikina et al., 2025). Volk et al. (2022), por exemplo, discutem casos nos quais culturas *in vitro* "axênicas" mostram contaminação latente mesmo após descontaminação superficial rigorosa, justamente por ação de endofíticos internos que não são erradicados após a esterilização superficial. Protocolos superficiais frequentemente falham em eliminar muitos desses microrganismos (Anikina et al., 2025).

A eficácia da esterilização superficial é complexa e depende de múltiplos fatores, como

a espécie da planta, o tipo de explante, a origem do material (campo versus viveiro) e a carga microbiana prévia (Şekerli 2024; Anikina et al., 2025). A escolha do agente esterilizante e a duração da exposição são cruciais, pois dependem das características do explante, sendo que diferentes espécies e cultivares podem apresentar sensibilidades distintas aos agentes esterilizantes e ao tempo de exposição (Anikina et al., 2025). Şekerli (2024), por exemplo, observou que o NaOCl sozinho foi ineficaz na redução da contaminação em explantes de avelã cultivados no campo.

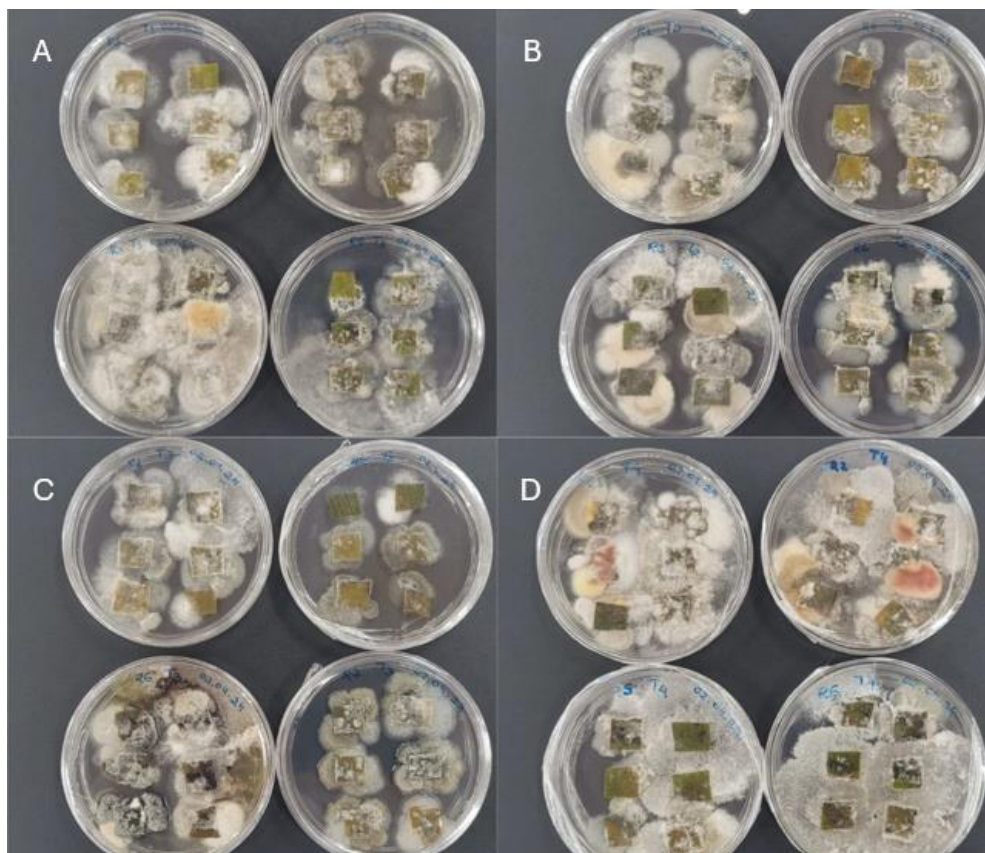


Figura 8. Aspectos da contaminação fúngica em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 1. (A) Tratamento 1 com 0,2% de NaClO e 0,03% HgCl₂. (B) Tratamento 2, com 0,5% de NaClO e 0,03% HgCl₂. (C) Tratamento 3, com 0,5% de NaClO e 0,05% HgCl₂. (D) Tratamento controle, sem aplicação de agentes desinfestantes.

Em face da ausência de sucesso dos tratamentos superficiais no Experimento 1, foi necessário implementar o Experimento 2, no qual se utilizou fungicida e diferentes tempos de exposição. Nesse segundo experimento de assepsia, verificou-se a persistência de contaminação fúngica, conforme observado na Figura 9. Notou-se que o tratamento 1, caracterizado pelo menor tempo de exposição (2 horas) ao fungicida utilizado, proporcionou 80,56% de contaminação fúngica, que embora numericamente superior, não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos: 2 (5 horas) e 3 (10 h), que apresentaram médias de

75,0% e 55,56%, respectivamente. Algumas placas submetidas ao tratamento 1 apresentaram 100% de contaminação (Fig. 10 A, B). Embora o tratamento 3 tenha reduzido numericamente o percentual de contaminação fúngica, interessante, ele diferiu estatisticamente dos demais tratamentos com relação ao percentual de contaminação bacteriana (88,9%) (Fig. 10 B). Esse resultado pode ser consequente da redução da competição por componentes dos meios, devido a menor taxa de contaminação fúngica. Adicionalmente, salienta-se que o tratamento 3 destacou-se em termos de contaminação fúngica e bacteriana (55,56%) ocorrendo simultaneamente (Fig. 10 C). A contaminação fúngica foi caracterizada pela coloração branca e muitas presença de esporos (Fig. 10 D). Já a bacteriana apresentou um aspecto branco leitoso (Fig. 10 E). Observou-se a presença de contaminação fúngica em todos os tratamentos, sendo que, embora a menor contaminação por fungos tenha sido registrada, ainda a contaminação bacteriana persistiu (Fig. 10).

A literatura suporta essa estratégia de uso de fungicidas ou antibióticos como complemento ao tratamento superficial. Ishibashi et al. (2017), ao investigarem o estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii*, pesquisaram a adição de fungicidas, incluindo o Cercobin®, ao meio de cultura para controlar a contaminação em explantes. Os resultados indicaram que a inclusão de fungicidas no meio de cultura é uma alternativa viável para o estabelecimento *in vitro* de explantes. Similarmente, Luz et al. (2024) avaliaram diferentes métodos de desinfestação na micropropagação de segmentos nodais de *Ocotea odorifera*. O tratamento mais eficaz para o controle da contaminação fúngica foi a imersão em Cercobin®, seguida pela imersão em uma solução de HgCl₂ a 0,05%, resultando em apenas 8% de contaminação por fungos.

Anikina et al. (2025), por outro lado, ressaltam que métodos químicos convencionais (álcool, hipoclorito, HgCl₂) frequentemente não são suficientes contra contaminação interna ou latente, e que fungicidas/antibióticos e agentes com atividade sistêmica ou interna são necessários especialmente para material nativo ou altamente contaminado.

Simões et al. (2024), ao trabalharem com o estabelecimento *in vitro* de folhas adultas de *Melanoxylon brauna*, observaram que os explantes provenientes de folhas de árvores dessa espécie apresentaram 100% de contaminação e oxidação em 15 dias. Isso indica que somente o uso de NaClO e do fungicida Cercobin®, nas concentrações e tempos de exposição testados, não foi eficaz para a descontaminação. Assim, recomenda-se a utilização de um antibiótico para controlar a contaminação bacteriana. Segundo Pereira et al. (2014), o uso de álcool e hipoclorito costuma ser eficiente no controle de contaminações fúngicas. Assim, dependendo do tipo de explante, a imersão em amoxicilina (antibiótico) pode ser necessária para evitar contaminações bacterianas presentes nos explantes (Handa; Sampaio; Quisen, 2005).

Palú et al. (2011), em estudos sobre a adição de antibióticos para o controle de bactérias endógenas na micropropagação de *Ficus carica*, observaram que a inclusão de antibióticos no meio de cultura foi essencial para o controle da contaminação bacteriana em gemas apicais de figueira. Além disso, a ampicilina sódica, na concentração de 250 mg L⁻¹, foi eficaz na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*, após a inoculação das gemas apicais, resultando em uma taxa de sobrevivência superior a 90% para os explantes.

Pereira et al. (2014) investigaram o uso de ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes durante a micropropagação da bananeira Thap maeo. Os resultados demonstraram que, na concentração de 20 mg L⁻¹, ambos os antibióticos foram eficazes na redução de até 70% da contaminação por fungos e bactérias, sem causar danos significativos aos explantes.

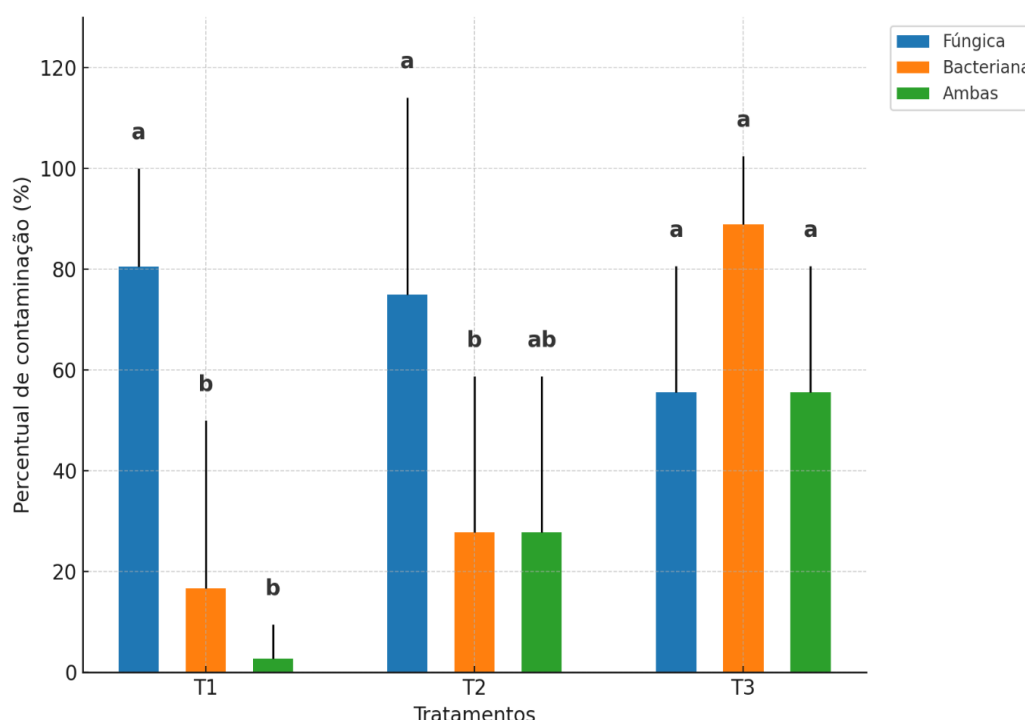


Figura 9. Percentual médio de contaminação fúngica, bacteriana e simultânea em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* submetidos a diferentes tratamentos de assepsia com fungicida (Experimento 2). As barras indicam o erro padrão. Letras iguais sobre as barras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

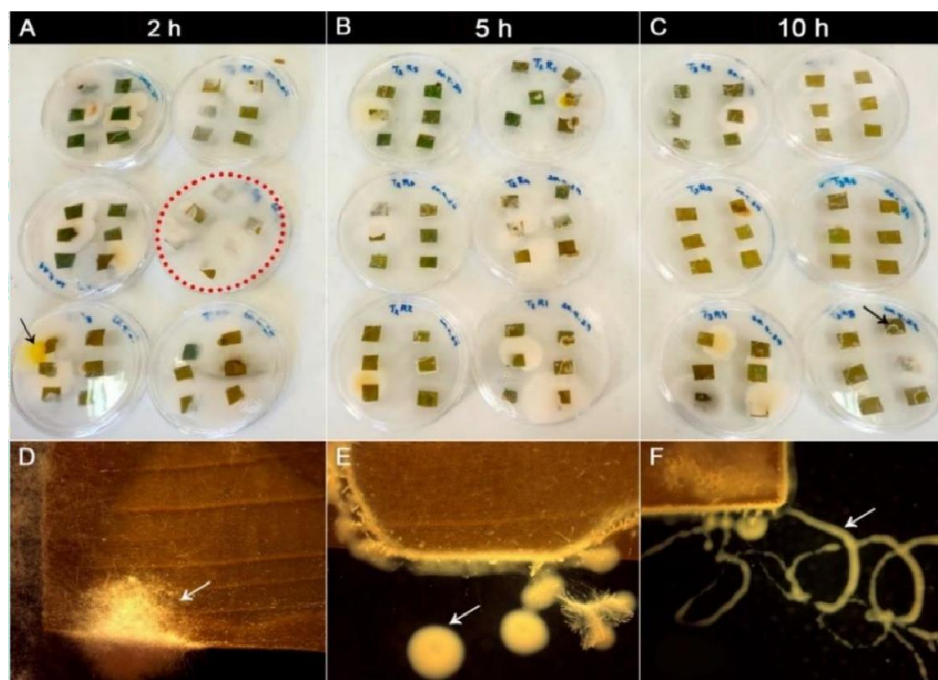


Figura 10. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 2 de assepsia. **(A)** Placa tomada por contaminação fúngica branca (círculo pontilhado vermelho). **(B)** Placas apresentando contaminação simultânea por fungos e bactérias. **(C)** Placas com menor contaminação fúngica e predominância bacteriana (seta preta). **(D)** Explante com contaminação fúngica evidente. **(E)** Presença concomitante de fungos e bactérias. **(F)** Contaminação bacteriana com formação de rastros (seta). Barras = 2 cm.

No Experimento 3, a assepsia por imersão em Cercobin® por 2, 5 ou 10 h, na presença ou ausência de ampicilina (500 mg L^{-1}), resultou em variações numéricas nas taxas de contaminação aos 7 e 30 dias, mas sem diferenças estatisticamente significativas para contaminação fúngica, bacteriana, fúngica + bacteriana ou oxidação (efeitos principais e interação). Para contaminação fúngica, observou-se apenas uma tendência de efeito do fator tempo de imersão em Cercobin®, sem alcançar significância. Descritivamente, sem antibiótico, no tratamento T1 (2 h), registrou-se 16,67% de contaminação fúngica aos 7 dias, aumentando para 27,78% aos 30 dias. O T2 (5 h) manteve-se livre de contaminação fúngica e bacteriana até o sétimo dia, contudo, aos 30 dias, apresentou 33,33% de contaminação fúngica e 11,11% bacteriana. Já o T3 (10 h) apresentou 38,89% de contaminação fúngica aos 7 dias, elevando-se para 66,67% aos 30 dias, enquanto a contaminação bacteriana foi detectada em 5,56% das amostras nesse período. Em todos os tratamentos sem adição de ampicilina, constatou-se ocorrência de contaminação bacteriana aos 30 dias. Na presença do antibiótico, o T1 apresentou incremento de 27,78% para 66,67% na contaminação fúngica entre 7 e 30 dias, sem registros de contaminação bacteriana. O T2 iniciou sem contaminação e alcançou 11,11% de infecção fúngica aos 30 dias, sendo o único a apresentar contaminação bacteriana nesse período. O T3, por sua vez, manteve percentuais semelhantes de contaminação fúngica nos

dois intervalos avaliados e não apresentou contaminação bacteriana (Tabela 6).

Tabela 6. Percentual de contaminação (fungos e bactérias) em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* introduzidos *in vitro* no Experimento 3, com e sem adição de antibiótico (ampicilina), aos 7 e 30 dias de cultivo. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão.

Condição	Tratamentos	Fúngica (7d)	Fúngica (30d)	Bacteriana (7d)	Bacteriana (7d)
Sem Antibiótico	T1 (2h)	16,67 $\pm$ 9,62	27,78 $\pm$ 27,78	0,00 $\pm$ 0,00	5,56 $\pm$ 5,56
	T2 (5h)	0,00 $\pm$ 0,00	33,33 $\pm$ 33,33	0,00 $\pm$ 0,00	11,11 $\pm$ 5,56
	T3 (10h)	38,89 $\pm$ 24,22	66,67 $\pm$ 33,33	0,00 $\pm$ 0,00	5,56 $\pm$ 5,56
Com Antibiótico	T1 (2h)	27,78 $\pm$ 20,03	66,67 $\pm$ 33,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	T2 (5h)	0,00 $\pm$ 0,00	11,11 $\pm$ 5,56	0,00 $\pm$ 0,00	5,56 $\pm$ 5,56
	T3 (10h)	5,56 $\pm$ 5,56	5,56 $\pm$ 5,56	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Além da contaminação fúngica e bacteriana, foram avaliadas as ocorrências de contaminação simultânea por fungos e bactérias e de oxidação dos explantes. A análise de variância não indicou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ou em função da adição de ampicilina ($p > 0,05$ para todos os fatores e interações). Descritivamente, os níveis de contaminação simultânea fúngica e bacteriana foram baixos em todos os tratamentos, não ultrapassando 5,56% nas avaliações de 7 e 30 dias, independentemente do uso do antibiótico. Da mesma forma, a oxidação apresentou incidências reduzidas e distribuídas de forma aleatória entre os tratamentos, sem indicar qualquer padrão associado ao tempo de imersão no Cercobin® ou à presença da ampicilina. Esses resultados reforçam que, no Experimento 3, a principal barreira continuou sendo a contaminação fúngica isolada, enquanto a contaminação bacteriana, a contaminação simultânea fúngica e bacteriana e a oxidação exerceram papel secundário e de baixa frequência.

Apesar da ausência de significância estatística, é notável que, em termos gerais, as taxas de contaminação no Experimento 3 foram mais baixas do que aquelas observadas nos Experimentos 1 e 2 (Figs. 8-12). Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que, no terceiro ensaio, as folhas utilizadas foram coletadas de plantas cuja parte aérea já havia senescido. Nessa condição, o estresse ambiental prévio é reduzido e a carga microbiana tende a ser menor, diferentemente das plantas coletadas diretamente no ambiente natural (Experimentos 1 e 2), que provavelmente trouxeram consigo microrganismos endêmicos e mais resistentes do ambiente de origem. Trabalhos prévios já destacam que plantas-matrizes provenientes de campo exibem maiores níveis de contaminação, enquanto material oriundo de

viveiro protegido ou casa de vegetação apresenta menores cargas iniciais, facilitando o estabelecimento *in vitro* (Niedz e Bausher, 2002; Rathore et al., 2015; Şekerli, 2024). Observações similares foram feitas em sistemas tropicais e lenhosos, nos quais a condição fisiológica da planta doadora influencia fortemente as taxas de colonização por endófitos (Bamba et al., 2021; Volk et al., 2022).

Conforme Medeiros (1999), os níveis de contaminação tendem a ser mais elevados quando as plantas- matrizes utilizadas como fonte de explantes provêm do campo. Entretanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiros protegidos ou em casas de vegetação podem ser fontes potenciais de microrganismos, que podem limitar os procedimentos de cultivo *in vitro*.

Erig e Schurch (2005), ao estudarem o estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) a partir de segmentos nodais, observaram ausência de contaminação bacteriana e de oxidação, enquanto a contaminação fúngica foi de apenas 1,36%. Esse resultado é provavelmente atribuído à manutenção das plantas matrizes em ambientes limpos e protegidos (casa de vegetação), bem como à pulverização prévia com antibióticos e fungicidas.

Assim, embora nenhum dos tratamentos de assepsia testados tenha se mostrado estatisticamente superior, os resultados reforçam que o manejo e a origem do material vegetal são fatores determinantes para o sucesso do estabelecimento *in vitro*, podendo ter peso equivalente ou até maior que os protocolos de assepsia aplicados.

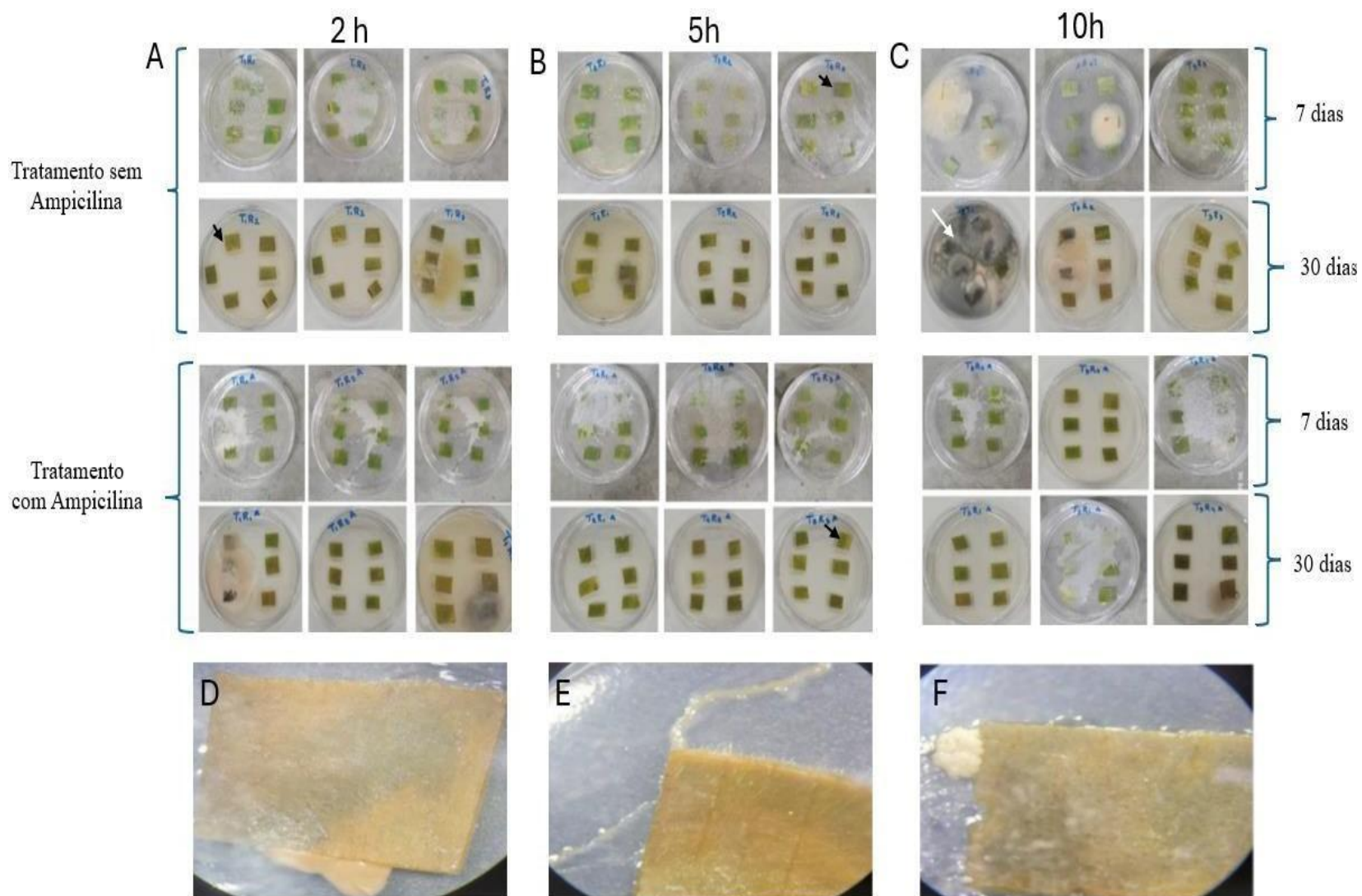


Figura 11. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 3 (asepsia com imersão em Cercobin® 0,5%, por diferentes tempos). (A–C) Explantes submetidos à imersão por 2 h (A), 5 h (B) e 10 h (C), em tratamentos sem e com adição de ampicilina ao meio de cultivo, avaliados aos 7 e 30 dias. As setas pretas indicam contaminação bacteriana localizada, enquanto a seta branca destaca uma placa totalmente tomada por contaminação fúngica. (D–F) Exemplos de contaminação bacteriana em explantes foliares, caracterizada por coloração marrom (D), formação de rastros (E) e crescimento em aglomerados (F).

Tabela 7. Médias ($\pm$ erro-padrão) da contaminação fúngica, bacteriana, oxidação e amarelecimento em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* (Experimento 3) obtidos de plantas-matrizes pulverizadas com Cercobin® (1%) por 7 dias (T1), 10 dias (T2) ou sem aplicação (T3, controle). Avaliações realizadas aos 7 e 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com espectinomicina (150 mg L⁻¹), BAP (2 mg L⁻¹) e cinetina (2 mg L⁻¹). Valores expressos em porcentagem de explantes afetados. Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Avaliação	Tratamentos	Cont. fúngica	Cont. bacteriana	Cont. fúngica e bacteriana	Oxidação	Amarelecimento	Oxidação e amarelecimento
7º dia	T1 (7 d)	72,22 $\pm$ 13,38 a	30,56 $\pm$ 14,54 a	30,56 $\pm$ 14,54 a	47,22 $\pm$ 10,90 a	77,78 $\pm$ 15,91 a	47,22 $\pm$ 10,90 a
	T2 (10 d)	16,67 $\pm$ 16,67 b	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	11,11 $\pm$ 11,11 a	16,67 $\pm$ 16,67 a	11,11 $\pm$ 11,11 a
	T3 (Controle)	80,56 $\pm$ 10,02 a	22,22 $\pm$ 14,06 a	22,22 $\pm$ 14,06 a	30,56 $\pm$ 11,72 b	44,45 $\pm$ 15,31 a	27,78 $\pm$ 12,67 a
	Tratamentos	Cont. fúngica	Cont. bacteriana	Cont. fúngica e bacteriana	Oxidação	Amarelecimento	Oxidação e amarelecimento
30 º dia	T1 (7 d)	88,89 $\pm$ 5,56 a	----	----	61,11 $\pm$ 12,67 b	2,78 $\pm$ 2,78 a	----
	T2 (10 d)	41,67 $\pm$ 20,07 b	----	----	75,00 $\pm$ 11,18 ab	2,78 $\pm$ 2,78 a	----
	T3 (Controle)	100,00 $\pm$ 0,00 a	----	----	100,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	----

Com relação ao Experimento 4, a pulverização de Cercobin® afetou de maneira distinta os parâmetros avaliados (Tabela 7). Aos 7 dias de cultivo *in vitro*, observaram-se diferenças significativas na contaminação fúngica ($p < 0,01$), com valores mais elevados no tratamento T2 (10 dias) em comparação a T1 (7 dias) e ao controle. A oxidação também foi influenciada ($p < 0,05$), sendo maior em T2 do que em T1, embora sem diferenças em relação ao controle. Já a contaminação bacteriana e o amarelecimento não apresentaram variações estatisticamente significativas entre os tratamentos, mantendo-se em níveis semelhantes.

Aos 30 dias de avaliação (Tabela 7), a contaminação fúngica manteve-se elevada em todos os tratamentos, mas com diferenças claras: T3 (controle) e T1 exibiram as maiores médias (100% e 88,9%, respectivamente), enquanto T2 apresentou redução significativa (41,7%). O mesmo padrão foi observado para a oxidação, com T3 apresentando os maiores valores (100%), seguido por T2 (75%) e T1 (61,1%), embora apenas T1 tenha diferido estatisticamente dos demais. O amarelecimento, por outro lado, manteve-se baixo em todos os tratamentos, sem diferenças significativas.

No Experimento 4, a pulverização prévia das plantas-matriz com Cercobin® 1% (metil tiofanato, benzimidazol sistêmico) por 7 dias (T1) ou 10 dias (T2) antecedeu o cultivo dos explantes em MS + espectinomicina (150 mg L^{-1}) + BAP (2 mg L^{-1}) + cinetina (2 mg L^{-1}). Aos sete dias, observaram-se níveis mais elevados de contaminação fúngica e oxidação em T1, em comparação a T2 e, em parte, ao controle, sugerindo um efeito inicial favorável do regime mais prolongado. Entretanto, após 30 dias, houve aumento da contaminação em ambos os tratamentos, destacando-se T2 com a menor incidência (41,7%), enquanto T1 (88,9%) e o controle (100%) permaneceram em patamares elevados (Tabela 7), sugerindo um benefício tardio do pré-condicionamento com fungicida. Esse comportamento é plausível para benzimidazóis sistêmicos: o metil tiofanato é translocado na planta e se converte em carbendazim, prolongando a proteção e conferindo ação protetora/curativa após um período de translocação e ativação metabólica. Trabalhos de revisão reforçam, como Bai et al. (2024), esse modo de ação sistêmico e a contribuição do carbendazim para a atividade antifúngica residual.

O pico inicial de oxidação e a maior contaminação em T2 aos 7 podem refletir estresse fisiológico do tecido e aumento transitório de fenóis, que sabidamente favorecem escurecimento/necrose e maior suscetibilidade à colonização microbiana. Em cultura de tecidos, a produção e oxidação de compostos fenólicos é um entrave clássico ao estabelecimento e pode ser modulada por condições de pré-tratamento e pela composição do meio (antioxidantes, adsorventes, reguladores) (Abdalla et al., 2022), um cenário consistente com o observado aqui.

O desempenho superior de T2 aos 30 dias está de acordo com relatos de que estratégias de manejo da planta-matriz (p. ex., pulverizações preventivas, ambiente protegido) reduzem a carga inicial e postergam a emergência de contaminantes, embora não eliminem endófitos, que podem recrudesce com o tempo. Revisões recentes enfatizam que protocolos de assepsia superficial frequentemente falham contra endófitos internos e que abordagens combinadas (manejo prévio + antimicrobianos no meio) são, muitas vezes, necessárias. A literatura também registra o uso de biocidas de amplo espectro no estabelecimento (p. ex., PPM™) como apoio adicional quando bem calibrado à espécie (Volk et al., 2022; Romadanova et al., 2022).

Em síntese, a pulverização com metil tiofanato por 10 dias (T2) não melhora consistentemente os parâmetros iniciais (7 dias), mas apresenta vantagem clara no controle fúngico tardio (30 dias). Para maximizar o ganho de T2 sem incorrer no pico inicial de oxidação, o passo lógico é testar ajustes finos (dose/intervalo) e combinações com mitigadores de fenóis/estresse (antioxidantes/adsorventes no meio) e com antimicrobianos cujo espectro seja compatível com a microbiota endofítica local, mantendo monitoramento em subcultivos para capturar re-emergência tardia (Abdalla et al., 2022; Volk et al., 2022).

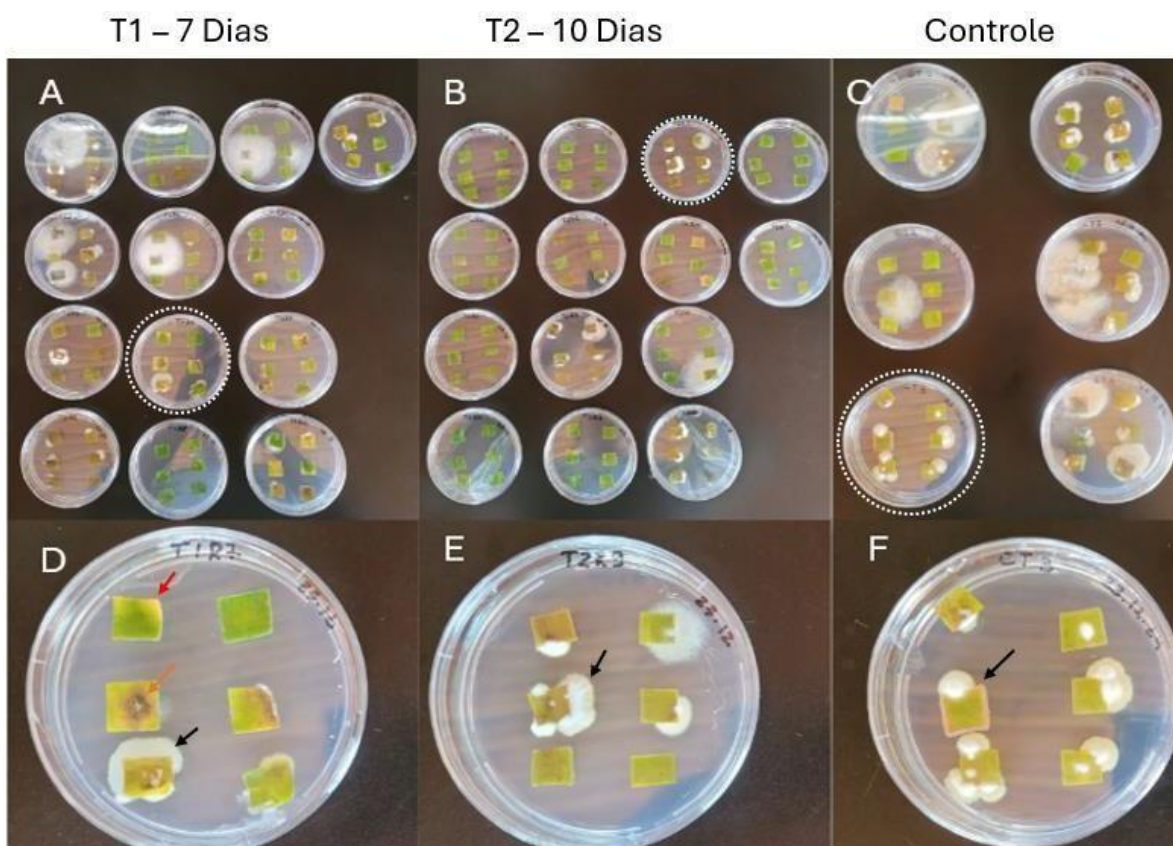
Neste experimento, a pulverização das plantas-matriz com Cercobin® 1% por 7 dias observaram-se níveis mais elevados de contaminação fúngica e oxidação em T1, em comparação a T2 e, em parte, ao controle, sugerindo um efeito inicial favorável do regime mais prolongado. Entretanto, após 30 dias, houve aumento da contaminação em ambos os tratamentos, destacando-se T2 com a menor incidência (41,7%), enquanto T1 (88,9%) e o controle (100%) permaneceram em patamares elevados (Tabela 7), sugerindo um benefício tardio do pré-condicionamento com fungicida. Esse comportamento é plausível para benzimidazóis sistêmicos: o metil tiofanato é translocado na planta e se converte em carbendazim, prolongando a proteção e conferindo ação protetora/curativa após um período de translocação e ativação metabólica. Trabalhos de revisão reforçam, como Bai et al. (2024), esse modo de ação sistêmico e a contribuição do carbendazim para a atividade antifúngica residual.

O pico inicial de oxidação e a maior contaminação em T2 aos 7 podem refletir estresse fisiológico do tecido e aumento transitório de fenóis, que sabidamente favorecem escurecimento/necrose e maior suscetibilidade à colonização microbiana. Em cultura de tecidos, a produção e oxidação de compostos fenólicos é um entrave clássico ao estabelecimento e pode ser modulada por condições de pré-tratamento e pela composição do meio (antioxidantes, adsorventes, reguladores) (Abdalla et al., 2022), um cenário consistente com o observado aqui.

O desempenho superior de T2 aos 30 dias está de acordo com relatos de que estratégias de manejo da planta-matriz (p. ex., pulverizações preventivas, ambiente protegido) reduzem a carga inicial e postergam a emergência de contaminantes, embora não eliminem endófitos, que podem recrudesce com o tempo. Revisões recentes enfatizam que protocolos de assepsia superficial frequentemente falham contra endófitos internos e que abordagens combinadas (manejo prévio + antimicrobianos no meio) são, muitas vezes, necessárias. A literatura também registra o uso de biocidas de amplo espectro no estabelecimento (p. ex., PPM™) como apoio adicional quando bem calibrado à espécie (Volk et al., 2022; Romadanova et al., 2022).

Em síntese, a pulverização com metil tiofanato por 10 dias (T2) não melhora consistentemente os parâmetros iniciais (7 dias), mas apresenta vantagem clara no controle fúngico tardio (30 dias). Para maximizar o ganho de T2 sem incorrer no pico inicial de oxidação, o passo lógico é testar ajustes finos (dose/intervalo) e combinações com mitigadores de fenóis/estresse (antioxidantes/adsorventes no meio) e com antimicrobianos cujo espectro seja compatível com a microbiota endofítica local, mantendo monitoramento em subcultivos para capturar re-emergência tardia (Abdalla et al., 2022; Volk et al., 2022).

Neste experimento, a pulverização das plantas-matriz com Cercobin® 1% por 7 dias (T1) ou 10 dias (T2) antecedeu a introdução dos explantes em MS + espectinomicina (150 mg L^{-1}) + BAP (2 mg L^{-1}) + cinetina (2 mg L^{-1}). O Cercobin® é um fungicida benzimidazólico de ação sistêmica (ativo: tiabendazol metílico), com uso preventivo e capacidade de proteção “de dentro para fora” da folha; portanto, faz sentido que regimes mais longos de pulverização reduzam o inóculo fúngico inicial que chega ao cultivo, sobretudo quando a fonte é material de campo. O T2 (10 dias) apresentou menor contaminação fúngica aos 30 dias (Tabela 7), sugerindo um benefício quantitativo do pré-condicionamento com fungicida, ainda que isso não elimine a possibilidade de reemergência de endófitos durante o cultivo, fenômeno recorrente descrito para materiais oriundos de campo/estufa e para acessos de bancos de germoplasma. Em paralelo, o meio de estabelecimento incluiu espectinomicina, antibiótico cujo alvo primário nas células vegetais é a tradução plastidial; ele tem utilidade como agente seletivo, mas não é um “cobertor” antibacteriano amplo contra endofíticos e pode inclusive induzir clorose/efeitos no cloroplasto quando a dose ou tempo não são calibrados à espécie, o que ajuda a explicar a persistência de contaminações tardias mesmo na presença do antibiótico. Em síntese, os resultados são coerentes com (i) o papel profilático de benzimidazóis sistêmicos para reduzir a carga fúngica inicial e (ii) a resiliência de comunidades endofíticas no longo prazo, recomendando combinar manejo prévio da planta-matriz (pulverização preventiva por mais tempo) com estratégias internas no meio



(antimicrobianos adequados ao espectro local) e monitoramento ao longo dos subcultivos.

Figura 12. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 4 (pulverização prévia das plantas- matrizes com Cercobin® 700 a 1%) aos 7 dias. **(A)** Tratamento 1, plantas pulverizadas por 7 dias, com destaque para a placa analisada (círculo pontilhado) **(B)** Tratamento 2, plantas pulverizadas por 10 dias, com placa analisada em destaque (círculo pontilhado). **(C)** Controle, plantas sem pulverização, com placa analisada (círculo pontilhado). **(D)** Explante amarelado (seta vermelha), oxidação do tecido (seta laranja) e contaminação mista (seta preta). **(E-F)** Exemplos de contaminação mista (seta preta).

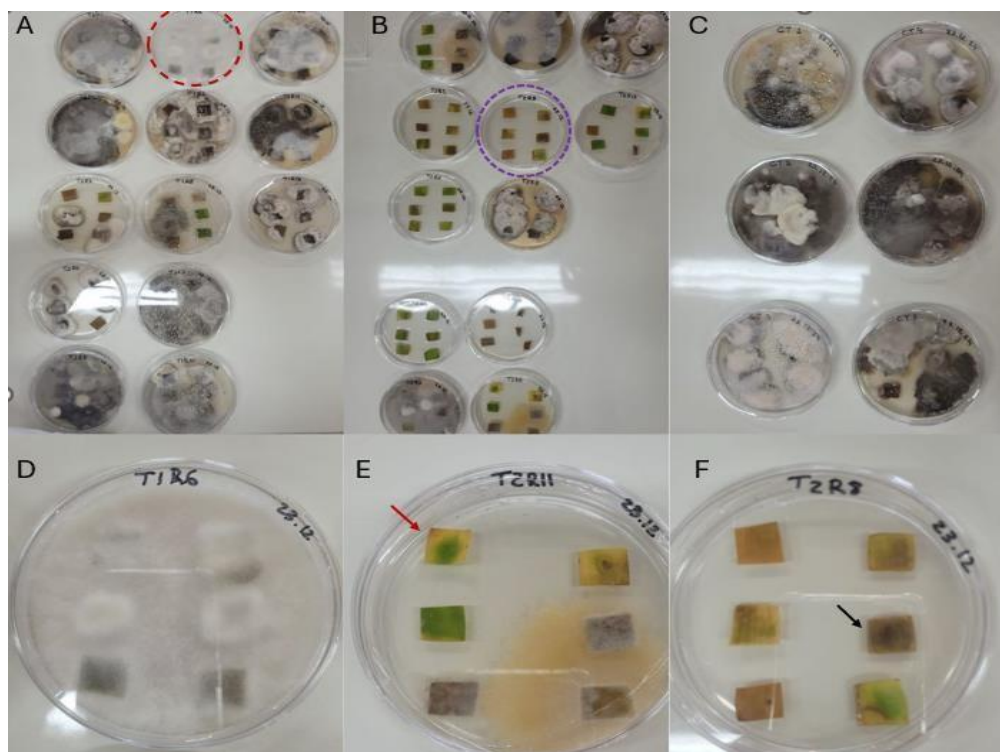


Figura 13. Aspectos da contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 4. **(A)** Tratamento 1: explantes oriundos de plantas pulverizadas com Cercobin® a 1% por 7 dias, apresentando placa totalmente contaminada por fungos (indicada pelos pontilhados vermelhos) aos 30 dias de cultivo. **(B)** Tratamento 2: explantes oriundos de plantas pulverizadas com Cercobin 700 a 1% por 10 dias, com placa sem contaminação por microrganismos (indicada pelos pontilhados lilases) aos 30 dias de cultivo. **(C)** Controle: explantes de contaminados por fungos. **(D)** Placa completamente tomada por contaminação fúngica. **(E)** Explante com aspecto amarelado (seta vermelha). **(F)** Explante com sinais de oxidação (seta preta).

No Experimento 4, Tratamento 2, foi registrada aos 60 dias a formação, na borda do explante foliar, de uma massa creme-amarelada, com superfície rugosa/convoluta. A observação em estereomicroscópio (Leica M205C) levantou a hipótese de calo; contudo, o corte anatômico e a fotomicrografia mostraram hifas e organização típica de crescimento micelial, descartando tecido calogênico (Fig. 14). A morfologia observada é compatível com descrições de colônias fúngicas em meios de cultura, frequentemente brancas a creme/amareladas, de textura flocosa/aveludada e superfície áspera, por vezes com reverso amarelado, características documentadas para diversos táxons (p.ex., *Penicillium*, *Trichoderma*) em meio de cultura de batata com glicose e meio de cultura de malte (Houbraken et al., 2016; Crous et al., 2017). A ocorrência tardia (60 dias) é condizente com a emergência de endófitos durante o cultivo prolongado, mesmo quando o estabelecimento inicial parece livre de microrganismos, um comportamento descrito para fungos endofíticos em diferentes sistemas (Volk et al., 2022).

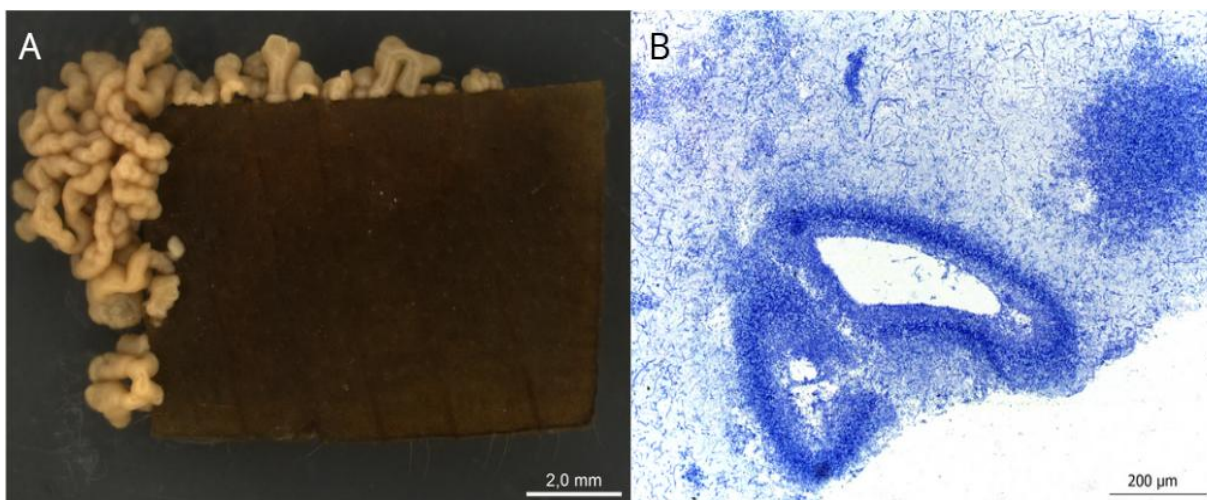


Figura 14. Aspectos morfológicos de fungos associados a explantes de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 4 aos 30 dias . **(A)** Colônias de fungos com coloração creme-amarelada com textura rugosa e aspecto cerebriforme observadas em estereomicroscópio Leica M205C em Lupa. **(B)** Estruturas fúngicas visualizadas em microscópio óptico (40x). Barra = 2 cm.

No Experimento 5, a imersão em H_2O_2 por 10 min levou a 100% de contaminação fúngica em todas as concentrações testadas (3%, 6%, 9% e 12%), indicando que a janela inicial de exposição não foi suficiente para conter o inóculo. Ao prolongar para 20 min, observou-se apenas redução discreta no grupo 3% ($91,7 \pm 8,3\%$), enquanto 6%, 9% e 12% permaneceram em 100%, sugerindo que, no seu material, o H_2O_2 atuou como agente de contato com efeito limitado frente à carga endofítica (Fig. 15). Esses resultados diferem dos relatados por Ahmadpoor et al. (2022), que, ao trabalharem com *Melia azedarach* L., observaram que o pré- tratamento dos explantes com benomil (2 g/L por 2 horas), seguido da esterilização com H_2O_2 a 7% por 10 minutos e NaOCl a 2% (sem ajuste de pH) por 12 minutos, reduziu significativamente os índices de contaminação e escurecimento, além de favorecer a indução e o crescimento de calos. Essa discrepância sugere que a eficácia do H_2O_2 pode depender não apenas da concentração e do tempo de exposição, mas também da sua associação com outros agentes desinfestantes, como fungicidas sistêmicos (ex.: benomil) e do uso de NaOCl em maior tempo de exposição, além das particularidades fisiológicas e anatômicas de cada espécie vegetal.

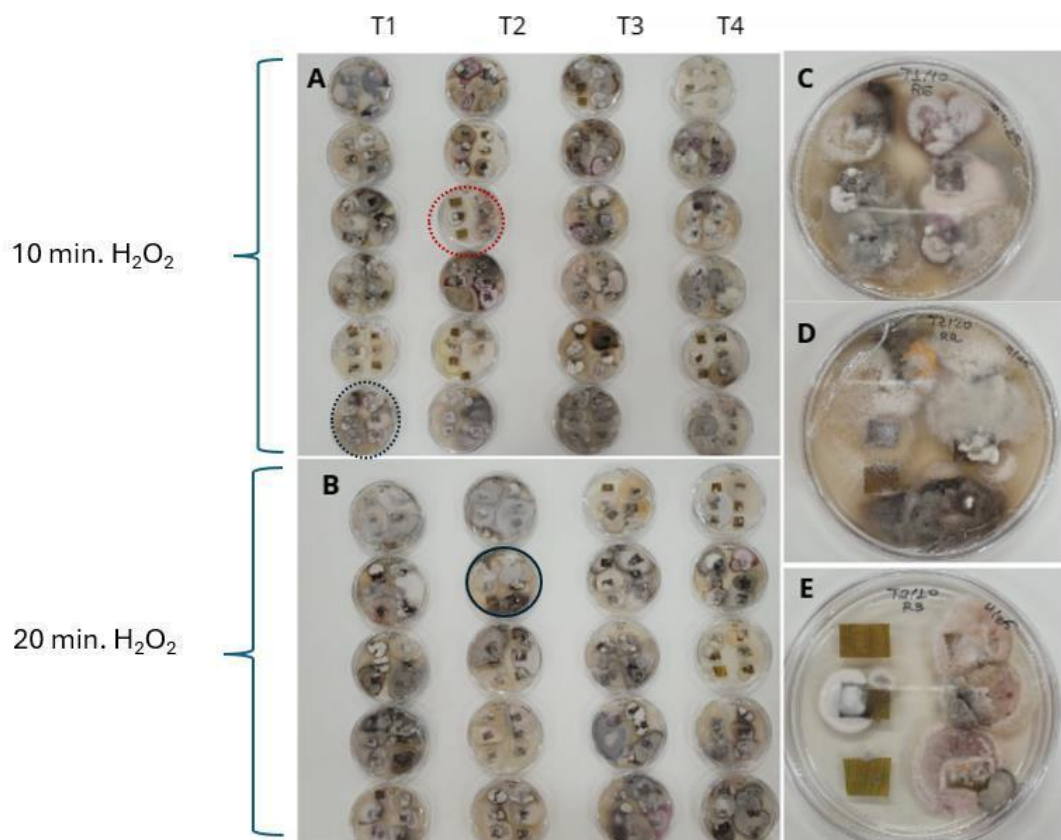


Figura 15. Aspectos da contaminação fúngica em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* submetidos ao tratamento com imersão em peróxido de hidrogênio por 10 minutos (Experimento 5). **(A)** Explantes com presença de contaminação fúngica. **(B)** Explantes com contaminação total após o mesmo tratamento. **(C–E)** Diferentes exemplos de colônias fúngicas observadas nos explantes.

No Experimento 6, conduzido em meio MS suplementado com Dioxiplus® e 2,4-D, verificou-se que, independentemente do tempo de exposição (10 ou 20 minutos) e das concentrações de H_2O_2 testadas (3%, 6%, 9% e 12%), todos os tratamentos apresentaram 100% de contaminação fúngica. Esses resultados demonstram que, nas condições avaliadas, a adição de Dioxiplus® não contribuiu para a redução da contaminação (Fig. 15). Em contraste, Hesami et al. (2019), ao trabalharem com crisântemo ornamental (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), observaram que o tratamento com H_2O_2 a 12% por 15 minutos de imersão promoveu baixa taxa de contaminação e elevada viabilidade dos explantes, evidenciando que a resposta ao uso do peróxido pode variar conforme a espécie e o protocolo empregado.

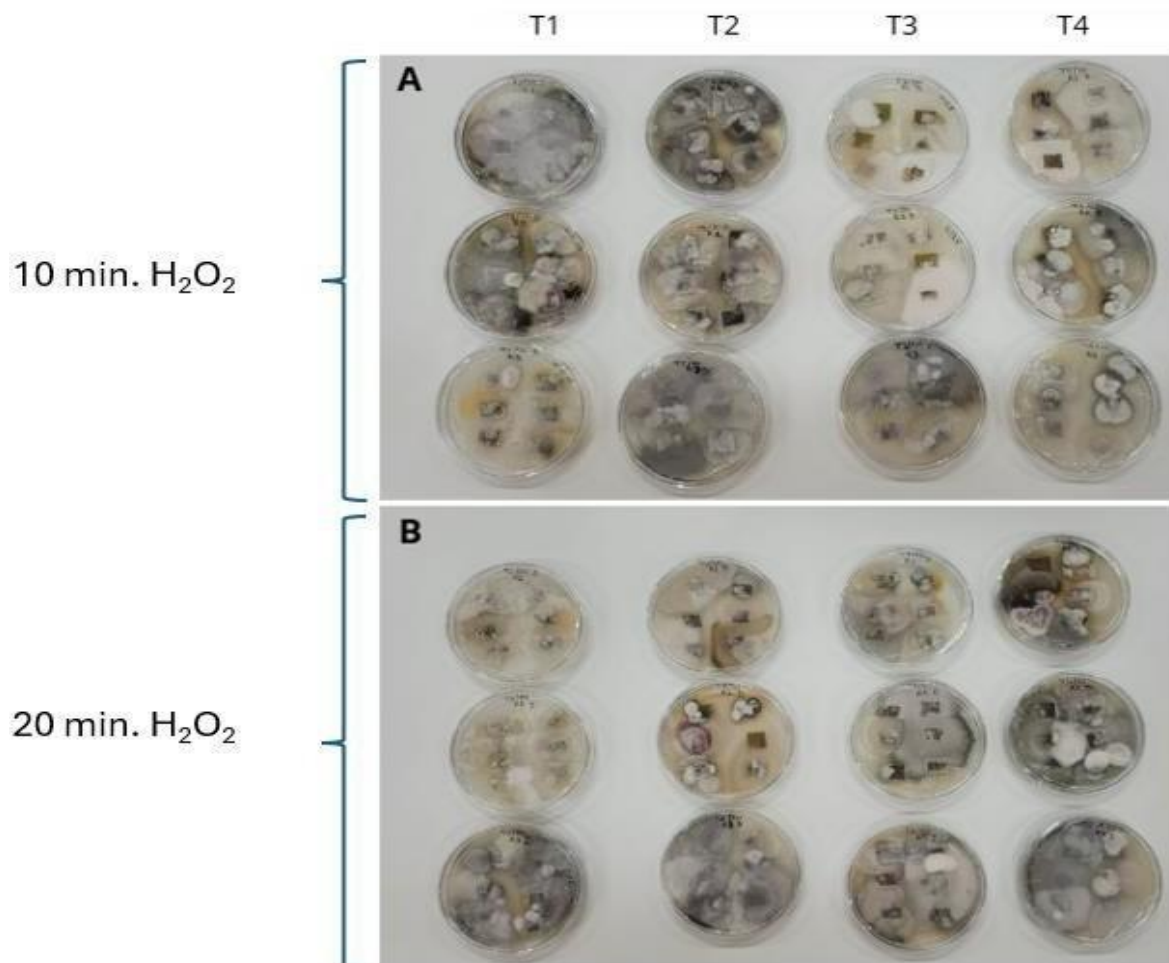


Figura 16. Contaminação em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento 6, cultivados em meio suplementado com Dioxiplus® e submetidos à imersão em peróxido de hidrogênio por 10 ou 20 minutos. (A, B) Explantes apresentando contaminação fúngica total, independentemente do tempo de imersão.

No Experimento 7, conduzido com a adição de Dioxiplus®, todas as repetições apresentaram 100% de contaminação fúngica, evidenciando a ineficácia do produto no controle de fungos nas condições avaliadas (Fig.17). Esse resultado contrasta com as observações de Rocha et al. (2024), que, ao utilizarem meio MS suplementado com Dioxiplus® e diferentes concentrações de 2,4-D (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹), verificaram respostas diferenciadas conforme o tipo de explante. Em *Dipteryx odorata*, apenas a concentração de 8 mg L⁻¹ promoveu formação de calos em segmentos foliares (8% de indução), enquanto nos segmentos cotiledonares a mesma concentração resultou em 25% de indução, demonstrando maior potencial de resposta nesse tipo de explante em relação às folhas. Assim, os resultados obtidos sugerem que, para *Chamaecostus subsessilis*, a concentração de 2,4-D deve ser reajustada de 1 mg L⁻¹ para 8 mg L⁻¹, a fim de favorecer a indução de calos em explantes foliares

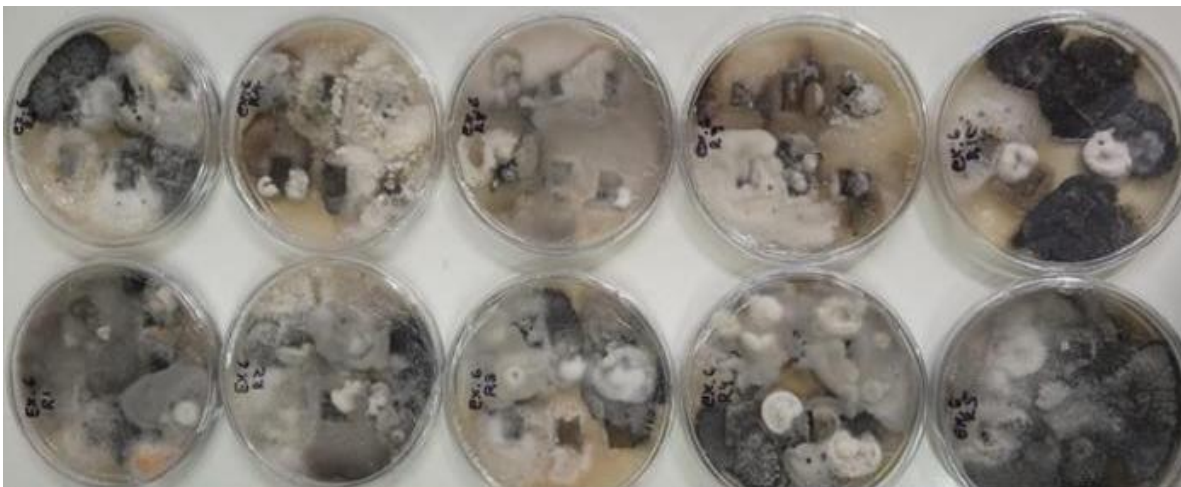


Figura 17. Caracterização morfológica de contaminantes fúngicos em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* no Experimento. Explantes com contaminação fúngica em todas as repetições do tratamento.

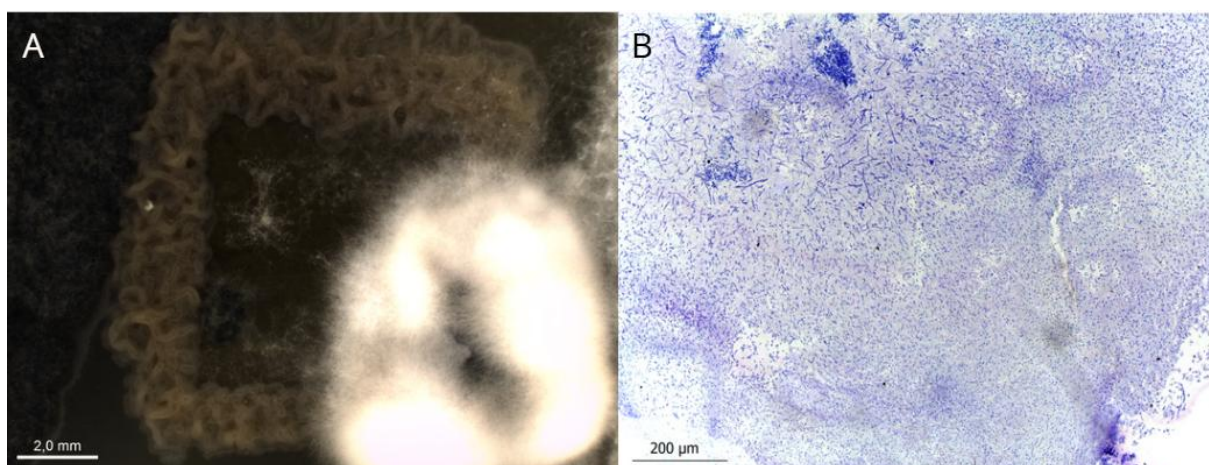


Figura 18. Caracterização morfológica de contaminantes fúngicos em explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis*. **(A)** Morfologia de colônias fúngicas, incluindo colônias brancas de aspecto aveludado e colônias creme de textura rugosa. **(B)** Estruturas fúngicas observadas em corte anatômico sob microscópio óptico (40×). Barra = 2 cm.

3.2 Identificação de contaminantes fúngicos por inoculação em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar)

Os fungos isolados, provenientes do Experimento 3, foram caracterizados com base em suas características morfológicas, permitindo a identificação de nove espécies distintas. Para análise molecular, realizou-se a extração de DNA de cada isolado, seguida de amplificação por PCR, visando confirmar a identidade genética dos microrganismos. Posteriormente, os isolados foram devidamente armazenados em bancos de contaminantes, constituindo uma referência para futuras pesquisas e garantindo a preservação de informações sobre a microbiota associada a explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis* cultivados *in vitro*.

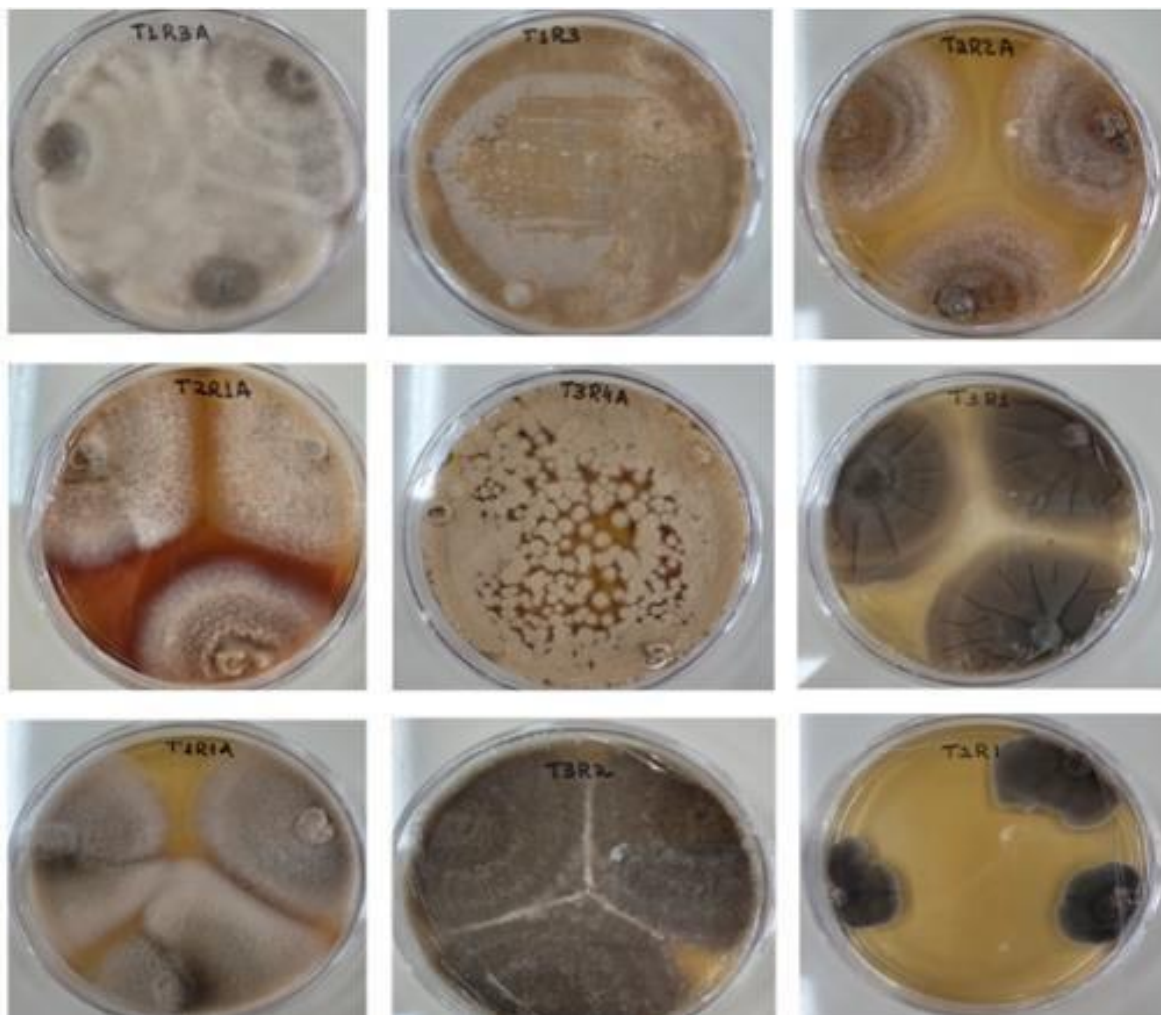


Figura 19. Fungos isolados de *Chamaecostus subsessilis* crescidos após 7 dias de incubação em BDA.

3.3 Estabelecimento de banco de DNA de contaminantes fúngicos para diagnose molecular

Conforme a análise da extração de DNA em gel de agarose, observou-se que a amostra 1 (T1R3A), extraída com 3% de CTAB, apresentou menor fragmentação de DNA, indicando melhor integridade da amostra (Fig. 19). Por outro lado, a amostra 7 (T3R1) exibiu baixa concentração de DNA em comparação com as demais, conforme evidenciado pela análise de concentração e pureza no NanoDrop, a qual apresentou o menor valor de concentração, sugerindo baixa presença de DNA. Além disso, a amostra 5 (T2R1A) apresentou uma razão 260/280 de 2,16, o que indica uma possível concentração elevada de RNA. Valores superiores a 2,0 sugerem a presença de RNA na amostra, uma vez que esse ácido nucléico possui uma razão 260/280 mais elevada, em torno de 2,0. Conforme o Boletim Técnico NanoDrop Lite (2012), a razão 260/280 de aproximadamente 1,8 é geralmente aceita como indicativa de DNA puro, enquanto uma razão em torno de 2,0 é considerada característica de RNA puro. Dessa forma, valores de absorbância a 280 nm entre 1,44 e 1,74 sugerem possível contaminação da amostra de DNA por proteínas ou resíduos de reagentes utilizados no processo de extração.

Nessas condições, recomenda-se a repetição da análise e, se necessário, a otimização do protocolo de extração para garantir maior pureza da amostra (Tab. 8, anexo 5)

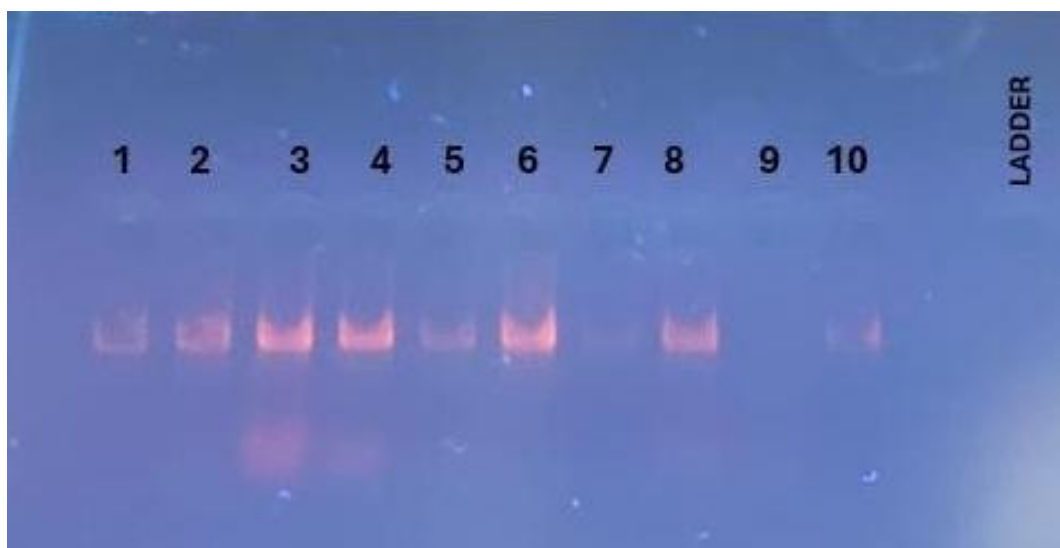


Figura 20. Perfil eletroforético do DNA genômico extraído de isolados fúngicos. Gel de agarose a 2% visualizado sob luz UV. *Ladder*: marcador de peso molecular; colunas 1 a 10: amostras de DNA genômico de diferentes isolados de fungos.



Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando o DNA de fungos associados a explantes foliares de *Chamaecostus subsessilis*, obtido no Experimento 3 após reação de PCR. *Ladder*: marcador de peso molecular; colunas 1–10: amostras de DNA de isolados fúngicos.

Os resultados da extração de DNA dos fungos, após a realização da PCR, indicaram que as amostras 7 (T3R1), 9 (T3R2) e 10 (T2R1) apresentaram baixa concentração de DNA. Diante disso, recomenda-se a repetição do procedimento, aumentando a concentração de DNA template de 1 μ L para 2 μ L, a fim de otimizar a amplificação (Fig. 20).

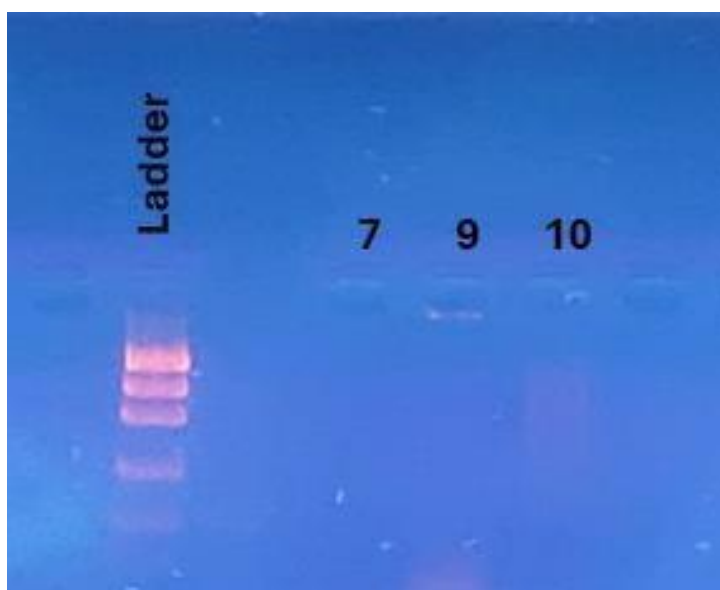


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando o DNA de fungos isolados após PCR. As amostras 7 (T3R1), 9 (T3R2) e 10 (T2R1), referentes ao Experimento 3. *Ladder*: marcador de peso molecular.

Após a repetição da análise, os resultados indicaram que as três amostras apresentaram uma quantidade insuficiente de DNA. Isso pode sugerir que a quantidade de fungos nas amostras pode ser baixa para ser detectada, ou que o DNA extraído estava contaminado com substâncias como proteínas, o que impediu a migração adequada do DNA no gel ou dificultou sua visualização (Fig. 21). Todas as amostras estão mantidas em freezer a -20° C para eventual sequenciamento futuro.

4. CONCLUSÕES

No Experimento 3, observou-se uma redução significativa na taxa de contaminação fúngica, possivelmente associada ao uso de folhas rebrotadas provenientes de plantas mantidas em casa de vegetação, as quais parecem apresentar menor carga inicial de microrganismos. O presente estudo representa um avanço relevante no estabelecimento de um protocolo de cultura *in vitro* para *Chamaecostus subsessilis*, constituindo um passo fundamental para o desenvolvimento de um sistema mais eficiente, com menor incidência de contaminação fúngica e com potencial para indução de calos.

Os resultados obtidos também sugerem que parte das contaminações detectadas tem origem endofítica, indicando que fungos associados internamente aos tecidos podem ser particularmente abundantes na espécie e constituem um obstáculo adicional ao cultivo asséptico.

No Experimento 6, a adição de Dioxiplus® ao meio de cultura, combinada à imersão prévia dos explantes em H₂O₂, resultou em 100% de contaminação fúngica (Fig. 16). Esse resultado está alinhado com a literatura, a qual demonstra que oxidantes e biocidas de contato, como peróxidos, são eficazes na redução da microbiota superficial, porém insuficientes para eliminar microrganismos endofíticos, que permanecem viáveis nos tecidos e podem emergir posteriormente durante o cultivo.

Por fim, a recorrência de contaminações por fungos e bactérias configurou-se como a principal limitação ao estabelecimento *in vitro* de *C. subsessilis*, persistindo mesmo após a implementação de protocolos rigorosos de desinfestação. Esses achados reforçam a necessidade de estratégias específicas para o controle de microbiota endofítica e apontam caminhos para otimizações futuras no protocolo de cultivo da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, N.; MAHMOUD, M. A.; ALI, A. A.; HESAMI, M. Machine learning for in vitro plant tissue culture: applications and perspectives. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 149, p. 1–18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02306-9>
- ALBERTO, R. N., CASSAROTI, R., ALMEIDA, T. T., & PAMPHILE, J. A. (2011). Identificação molecular de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum*. *VII EPCC–Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. Editora CESUMAR, Maringá–Paraná*.
- ANDRÉ, THIAGO. Biogeografia e diversificação de Costaceae neotropicais. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015
- ANDRÉ, THIAGO; SPECHT, CHELSEA D.; SALZMAN, SHAYLA; PALMA-SILVA, CLARISSE; WENDT, TÂNIA. Evolution of species diversity in the genus *Chamaecostus* (Costaceae): molecular phylogenetics and morphometric approaches. *Phytotaxa*, v. 204, n. 4, p. 265–276, Apr. 2015. DOI: 10.11646/phytotaxa.204.4.3 [Zenodo](#)
- ANIKINA, A. G.; TSYMPILOV, V. S.; TURCHINSKII, N. V.; OGANOVA, M. A.; ALEXANDROV, A. A.; et al. Modeling of Human Inflammatory Bowel Disease in Rodents. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, v. 19, n. 1, art. 556004, 2025.
- AHMADPOOR F, ZARE N, ASGHARI R, SHEIKHZADEH P. Protocolos de esterilização e o efeito dos reguladores de crescimento de plantas na indução de calos e produção de metabólitos secundários em culturas in vitro *Melia azedarach* L. *AMB Express*. 10 de janeiro de 2022; 12(1):3. DOI: 10.1186/S13568-022-01343- 8. PMID: 35006397; PMCID: PMC8748552.
- BAI, XIAOFANG; DAG, DAMLA; JUNG, JOOYEOUN; ZHAO, YANYUN. Investigation of antioxidant edible coating and modified atmosphere packaging for enhancing storability of hazelnut kernels. *Journal of Agriculture and Food Research*, v. 17, art. 101246, 2024. DOI: 10.1016/j.jafr.2024.101246
- BAMBA, C.; NGONE, G.; SALAMATA, D.; POLÈLE, F.; AÏSSÉ, T.; GNAGNA, D.; et al. Gastritis: Sociodemographic, Clinical, Endoscopic and Histological Aspects, about 593 Cases at the Digestive Endoscopy Unit of the General Hospital Idrissa Pouye. *Open Journal of Gastroenterology*, v. 11, p. 184–193, 2021.
- BHARATHI, J. K., ANANDAN, R., RAMESHKUMAR, S., MENAKA, K., & PRAKASH, M. A. S. (2022). Development of an efficient in vitro regeneration system in *Costus speciosus*—an important herbal insulin plant. *South African Journal of Botany*, 149, 468–475.

- BORGES, E. M. E. S. (2018). Desinfestação dos explantes do sisal (*Agave sisalana* Perrine) para o cultivo *in vitro*.
- CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). *Rev. Árvore*, v. 31, n. 4, p. 717-730, 2007.
- CHAKRABORTY, A., SANTRA, I., HAQUE, S. M., & GHOSH, B. (2023). *In vitro* conservation of commercial and threatened members of Zingiberaceae: an Indian scenario. *Biodiversity and Conservation*, 1- 41.
- CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; BURGESS, T. I.; HARDY, G. E. S. J.; GENE, J.; GOMES, R. R.; et al. Fungal Planet description sheets: 558–624. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 38, p. 240–384, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.38.09>
- DE ALMEIDA MACEDO, W., LEITE, D. M., & KARSBURG, I. V. (2021). Cytotoxicity, genotoxicity and antiproliferative effect of *Costus Scaber* Ruiz & Pav (Costaceae): a contribution to folk medicine, oncology and genetic improvement. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 42147-42163.
- DA LUZ, S. C. D. S., PEREIRA, J. R., RIBAS, L. L. F., DE ALCANTARA, G. B., KOEHLER, H. S., & ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. (2024). Diferentes tratamentos de desinfestação *in vitro* na micropropagação de segmentos nodais de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). *DELOS: Desarrollo Local Sostenible*, 17(54), e1411-e1411.
- DAS, A.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, S. Coastal land loss and hypoxia: the 'outwelling' hypothesis revisited. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 87, n. 1, p. 1–9, 2010
- DE FARIA, R. T., DALIO, R. J. D., UNEMOTO, L. K., & DA SILVA, G. L. (2006). Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl.(Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 28(1), 1-4.
- GASTÃO, K.J. 1994. Raridade. *Série de Biologia Populacional e Comunitária* 13: 1—205. Chapman & Hall, Londres, Reino Unido.
- DIVENGI, J. P. N., Idrissa, A. Z., Kabasele, D. M., Mbuyi, P. L., Walle, I. S., Lesse, V. M., ... & Mukeba, F. B. (2022). *Costus afer* Ker Gawl. (Costaceae): Uma revisão sobre seus usos medicinais com foco no potencial efeito anti-inflamatório. *J Pesquisa Farmacêutica Internacional*, 34(41A), 6-23.

- ERIG, A. C., & SCHUCH, M. W. (2005). Estabelecimento in vitro de mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria*, 6(1-2), 91-96.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220 p. 1998.
- GAUDÊNCIO, R., MIRANDA, D., & KARSBURG, I. V. (2014). Germinação *in vitro* de sementes de *Catsetum schmidtianum* Miranda & Lacerda em diferentes gelificantes alternativos. *ENCICLOPEDIA BIOSFERA*, 10(18).
- GEORGE, Carol; KAPLAN, Naomi; MAIN, Mary. *The Adult Attachment Interview*. 1996
- GU, ALBERT; GOEL, KARAN; RÉ, CHRISTOPHER. Efficiently modeling long sequences with structured state spaces. *arXiv*, 2021
- HANDA, LUCIA; SAMPAIO, PAULO DE TARSO B.; QUISEN, REGINA CAETANO. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazônica*, v. 35, n. 1, p. 29– 33, 2005
- HATCHER H, PLANALP R, CHO J, TORTI FM, TORTI SV (2008) Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 65(11):1631–1652
- HESAMI, M.; DANESHVAR, M. H.; YOONSEE, M.; ALIZADEH, M. Modeling and optimizing in vitro sterilization of chrysanthemum using artificial neural network and genetic algorithm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 139, p. 599–611, 2019
- HOUBRAKEN, J.; VISMARA, P.; MEIJER, M.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, v. 85, p. 1–36, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.005>
- ISHIBASHI, V., KOGUTA, K. V., JUNIOR, P. C. F., & HIGA, A. R. (2017). Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild.(Fabaceae). *Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909*, 13(1), 15-21.
- MIRHOSSEINI SZ, SEIDAVI A, SHIVAZAD M, CHAMANI M, SADEGHI AA, POURSEIFY R. Detection of *Clostridium* sp. and its Relation to Different Ages and Gastrointestinal Segments as Measured by Molecular Analysis of 16S rRNA Genes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011; 53(1): 69-76.
- NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field- grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 38, n. 5, p. 468–471, 2002.

- KAUR, M., & MANNAN, A. (2021). *In vitro* Antidiabetic Activity of *Chamaecostus cuspidatus*. *Int J Pharmacogn*, 14(1), 496-501.
- KELL, S. et al, (2008). Crops and wild relatives of the Euro-Mediterranean region: making and using a conservation catalogue. In: Maxted, N. et al, Crop wild relative conservation and use. CAB International, Wallingford, UK
- KUMAR, NITISH; REDDY, M. P. In vitro Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest and Environmental Science*, v. 27, n. 2, p. 61–72, Aug. 2011. DOI: 10.7747/JFS.2011.27.2.1 KoreaScience
- KUMAR, V. S. A.; PRAMEELA, T. S. Phytoremediation potential and biochemical response of oil crops to soil heavy metals – A case study with *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae). *Journal of Advanced Scientific Research*, v. 12, n. 1, suplemento 1, p. 255–266, 2021.
- LAFETÁ, B., GERAIS-IFMG-BRASIL, M., PENIDO, T. M. A., SUGAWARA, M. T., & DE CAMPOS, P. M. (2015). Assepsia de explantes caulinares de eucalipto com fungicida sistêmico. *Revista Científica Vozes dos Vales*, 8, 2-14.
- LEÓN, B., PITMAN, N., & ROQUE, J. (2006). Introducción a las plantas endémicas del Perú. *Revista peruana de biología*, 13(2), 9-22.
- LUZ, CÍNTIA LUIZA DA SILVA; BONIFÁCIO, PAOLA FERNANDA CARDOSO; MARTARELLO, NATÁLIA SÊNEDA; First mini-cutting protocol for *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafras): Effects of indole-3-butyric acid, seasonal variability, and anatomical features of mini-cuttings on adventitious rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 157, p. 70, 2024.
- MAAS, P. J. M.; MAAS-VAN DE KAMER, H.; ANDRÉ, T.; SKINNER, D.; VALDERRAMA, E.; SPECHT, C. D. Eighteen new species of Neotropical Costaceae (Zingiberales). *PhytoKeys*, v. 222, p. 75–127, 22 mar. 2023. DOI: 10.3897/phytokeys.222.87779
- MEDEIROS, C. P. C. Indução in vitro de respostas morfogénicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.). 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.
- MENEZES, C., MIRANDA, D., NASCIMENTO, H., DAHMER, N., & KARSBURG, I. V. (2015). germinação e desenvolvimento de *Cattleya violacea* Rolfe *in vitro* em meios de cultura alternativos. *Enciclopédia Biosfera*, 11(21).

- MURASHIGE, TOSHIO; SKOOG, FOLKE K. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052
- NAVES, V. C., DE OLIVEIRA PAIVA, P. D., PAIVA, R., PASQUAL, M., & PAIVA, L. V. (2003). Avaliação de diferentes concentrações dos meios de cultura MS e Knudson para propagação *in vitro* da bromélia-imperial. *Ornamental Horticulture*, 9(2).
- NIEDZ, Randall P.; BAUSHER, Michael G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 38, p. 468–471, 2002
- PALÚ, E. G., CORRÊA, L. D. 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, 587-592.
- PEREIRA, GUSTAVO ALVES; BOLIANI, APARECIDA CONCEIÇÃO; FURLANI JUNIOR, ENES. Uso da ampicilina sódica e cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira ‘Thap Maeo’. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 61, n. 3, p. 299–305, 2014. DOI: 10.1590/0034-737X201461030001.
- PINTO, F. C. J., LIMA, D. B. D., AGUSTINI, B. C., DALLAGASSA, C. B., SHIMABUKURO, M. F., CHIMELLI, M., ... & BONFIM, T. M. B. (2012). Morphological and molecular identification of filamentous fungi isolated from cosmetic powders. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 897-901
- POOBATHY, D.; GNASEKARAN, P.; MAHMOOD, M.; SAMIAN, M. R.; SUBRAMANIAM, S. Surface sterilization and micropropagation of *Ludisia discolor*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 137, p. 105–115, 2019.
- PRASANNA, S.; VERMA, P.; BODH, S. The role of food industries in sustainability transition: a review. *Environment, Development and Sustainability*, v. 26, p. 1–23, 2024. DOI: 10.1007/s10668-024-04642-1.
- RAHMAN, A.; IQBAL, Z.; BUNN, J.; LOVEL, H.; HARRINGTON, R. Impact of maternal depression on infant nutritional status and illness: a cohort study. *Archives of General Psychiatry*, v. 61, n. 9, p. 946–952, 2004
- RAIZER, M. D. M. (2017). Identificação e caracterização de plantas poliploides de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink.
- RATHORE, JITENDRA SINGH; RAI, MANOJ K.; PHULWARIA, MAHENDRA. A liquid culture system for improved micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. indica

and ex vitro rooting. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India - Section B: Biological Sciences*, v. 84, p. 193–200, 2014.

REED, BARBARA M.; TANPRASTERT, PIYARAK. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v. 1, n. 3, p. 137–142, 1995

ROMADANOVA, N. V.; ZHURAVLEV, Y. N.; GABIDULLINA, N. V.; YAKOVLEVA, O. V.; GLAGOLYEVA, Y. A. Effect of plant growth regulators on callus formation and somatic embryogenesis in *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 69, n. 3, p. 580–588, 2022

ROCHA, TAINÁ TEIXEIRA; PAIVA, RENATO; SOUZA, AFONSO RODRIGUES; SILVA, BRENDA TAYNA SOUSA DA; FRIEDRICH, HAIRON ANTONIO FRIEDRICH; BRITO, IARA CRISTINA; SILVA, GABRIEL ALVES DA SILVA; HERRERA, RAÍRYS CRAVO. Diferentes explantes e reguladores de crescimento na indução de calos em *Dipteryx odorata* (Aubl.) Forsyth F. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, [S.l.], v. 28, n. 1, p. 12–16, 2024. DOI: 10.17921/1415-6938.2024v28n1p12-16. RUBLUO, A., CHÁVEZ, V., MARTÍNEZ, A. P., & MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, O. (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in-vitro culture. *Biological Conservation*, 63(2), 163-169.

SALVIATÍ, E. J. (1993). Tipos vegetais aplicados ao paisagismo. *Paisagem e Ambiente*, (5), 9-45.

SAMIEI, NILOUFAR; DEHGHAN, HOOMAN; POURMOJIB, MARYAM; MOHEBBI, AHMAD; HOSSEINI, SAEID; REZAEI, YOUSEF. Isolated double-orifice mitral valve in a young girl. *ARYA Atherosclerosis*, v. 13, n. 6, p. 295–298, nov. 2017

ŞEKERLİ, MERVE. Season, thermotherapy and surface sterilization play important roles in microbial contamination of hazelnut in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 157, p. 70, 2024. DOI: 10.1007/s11240-024-02799-1

SIMÕES, I. M., de Carvalho, S. W. S., Silva, J., Costa, D. P. F., Lopes, J. C., & Sobreira, R. Estabelecimento *in vitro* de folhas de plantas adultas de *Melanoxylon braúna*.

SIQUEIRA FILHO, EZEQUIAS PESSOA DE; BRAGA, ANA CAROLINA SOARES; GALLIGANI, FERNANDO; FAGUNDES, ELAINE MARIA DE SOUZA; COTA, BETANIA BARROS. Saponins from the rhizomes of *Chamaecostus subsessilis* and their cytotoxic activity against HL60 human promyelocytic leukemia cells. *Journal of Pharmaceutical and Pharmacognosy Research*, v. 8, n. 5, p. 466–474, 2020. Arca Fiocruz

- SOUNDAR RAJU, C.; VARUTHARAJU, K.; THILIP, C.; ASLAM, A.; SHAJAHAN, A. Rhizogenesis in cell suspension culture from mango ginger: a source of isosorbide and n-hexadecanoic acid. *3 Biotech*, v. 5, p. 949–956, 2015.
- SOUTO, N., ULISSES, C., PAULINO, P., MANÇO, G., WILLADINO, L., & CÂMARA, T. (2007). Segmentos nodais e gemas axilares utilizadas como fonte de explantes na micropropagação de *Tapeinochilos ananassae* Hassk. *Ornamental Horticulture*, 13, 504–507.
- STEVENS, P. (2017). Angiosperm phylogeny website. version 12, july 2012 [and more or less continuously updated since](2001). URL <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.(Accessed 2 December 2015).
- THERMO SCIENTIFIC. *NanoDrop Lite Spectrophotometer: Technical Bulletin*. Wilmington, DE: Thermo Fisher Scientific, 2012. 4 p.
- TYAGI, P. K.; MANDAL, A. B.; ELANGO VAN, A. V.; TYAGI, P. K.; JOHRI, A. K.; KAUR, S. Growth performance and carcass traits of broiler chickens as influenced by feeding of finger millet. *Indian Journal of Poultry Science*, v. 39, n. 2, p. 131–135, 2004
- TYAGI, A. K.; SINGH, S.; TYAGI, M.; TYAGI, A. K.; SINGH, S.; TYAGI, M. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, v. 22, p. 231–241, 2007
- VOLK, G. M.; HESLOP-HARRISON, P.; HEREDIA, A.; WANG, M. R.; DUMET, D. Ex situ plant cryopreservation: progress and prospects. *Plants*, v. 11, n. 18, p. 2384, 2022
- VOS, PIETER; HOGERS, RENE; BLEEKER, MARJO; REIJANS, MARTIN; VAN DE LEE, THEO; HORNES, MIRANDA; FRIJTERS, ADRIE; POT, JERINA; PELEMAN, JOHAN; KUIPER, MARTIN. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407–4414, nov. 1995. DOI: 10.1093/nar/23.21.4407.
- WATANABE T. Pictorial atlas of soil and seed fungi - morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press; 2002
- YEE, A. T. K.; LAI, H. R.; CHONG, K. Y.; CHAN, S. Y.; LEE, T. S.; CHONG, K. Y. Ten years after: what we learned from the Mandai storm forest. *Biological Conservation*, v. 235, p. 1–10, 2019.

6. ANEXOS

Anexo 1. Tabela 1. Tratamento com fungicida Cercobin® (1%) realizado na casa de vegetação do CRAD/UnB.

Tratamento 1 (7 dias)				Tratamento 2 (10 dias)		
Dia	Manhã	Tarde	Noite	Manhã	Tarde	Noite
1				x		
2				x		
3				x		
4	x			x		
5	x			x		
6	x			x		
7	x			x		
8	x	x		x	x	
9	x	x		x	x	
10	x	x	x	x	x	x

Anexo 2. Tabela 3. Relação dos fungos contaminantes obtidos de explantes de *Chamaecostus subsessilis* destinados à extração de DNA.

Número	Amostra
1	T1R3A (CTAB 3%)
2	T1R3A (CTAB 1%)
3	T1R3
4	T1R2A
5	T2R1A
6	T3R4A
7	T3R1
8	T1R1A
9	T3R2
10	T2R1

Anexo 3. Tabela 4. Primers utilizados na reação de PCR e no sequenciamento do gene ITS, com suas respectivas referências.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Referências
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990

Anexo 4. Tabela 5. Composição da reação de PCR recomendada para amplificação da região ITS, utilizando tampão de PCR (Mg²⁺ plus).

Reagentes	Quantidade por amostra	Quantidade total (x12)
Água destilada autoclavada	41,2 µL	494,4 µL
Tampão10x	5 µL	60 µL
MgCl	0,5 µL	6 µL
dNTP 10mM (cada)	1 µL	12 µL
Primer ITS 1F (20 µM)	0,4 µL	4,8 µL
Primer ITS 4 (20 µM)	0,4 µL	4,8 µL
DNA template	1 µL	12 µL
Taq DNA Polimerase (5 U/µl)	0,5 µL	6 µL
TOTAL	50 µL	600 µL

Anexo 5. Tabela 8. Análise de Pureza e Concentração de DNA/RNA por Espectrofotometria (Nanodrop).

Número	Amostra	Concentração (ng/µL)	Absorbância (A260)	Absorbância (A280)
1	T1R3A*	444.2	8.884	1.74
2	T1R3A	173.4	34.629	1.66
3	T1R3	2005.7	40.114	1.69
4	T1R2A	1973.4	39.467	1.72
5	T2R1A	1538.2	30.764	2.16
6	T3R4A	689.3	13.785	1.70
7	T3R1	100.0	2.000	1.44
8	T1R1A	1971.0	39.421	1.54
9	T3R2	1629.9	32.597	1.74
10	T2R1	804.4	16.087	1.52

Manuscript formatted for submission to the Acta Botanica Brasilica, ISSN: 0102-3306,
on-line ISSN: 1677-941X Original Article

***In vitro* establishment of *Chamaecostus subsessilis*
(Costaceae): a test of aseptic strategies to support
micropropagation for *ex situ* conservation**

Running Head: Micropropagation of *Chamaecostus subsessilis*

Flávia Regina da Silva do Espírito Santo^{1,*}, Inaê Mariê Araújo Silva-Cardoso^{1,2,*},
Thiago André¹

¹University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Department of Botany, Brasília,
Distrito Federal, Brazil

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brazil

*Corresponding author: flaviareginases@unb.br

Abstract

Chamaecostus subsessilis (Costaceae) is a rare Cerrado species whose population decline requires ex situ conservation strategies. This study evaluated in vitro introduction strategies using leaf explants as an enabling step for micropropagation. The following treatments were tested: pre-spraying with Cercobin® 1% for 7 or 10 days; sequential disinfestation (70% ethanol, NaClO 0.2–0.5%, and HgCl₂ 0–0.05%); immersion in Cercobin® 0.2% (2, 5, and 10 h); antimicrobials (MS medium with/without ampicillin 500 mg L⁻¹; and, in separate assays, spectinomycin 150 mg L⁻¹); H₂O₂ 3–12% for 10–20 min; Dioxiplus®; in addition to MS media supplemented, depending on the assay, with BAP/kinetin or 2,4-D and PVP. Explants were maintained at 23 °C, in the dark, and evaluated for fungal/bacterial contamination and oxidation; suspicious structures were analyzed anatomically. In the initial experiment, fungal contamination reached 100%. Pre-spraying for 10 days reduced contamination in the short term (7th day), but resurgence occurred at 30 days. H₂O₂ and Dioxiplus® did not reduce contamination under the tested conditions; ampicillin showed limited effect and, with spectinomycin, contamination persisted. Oxidation was frequent (up to 79%). DNA extraction/quantification indicated insufficient yield and/or purity below the ideal threshold for molecular identification by ITS-PCR (despite better point integrity with CTAB 3%). It is concluded that failure in culture establishment resulted from recurrent contamination (likely endophytic) and oxidation. Recommendations include: (i) recalibrating asepsis (longer pre-spraying and adjustment of sterilant dose/time), and (ii) selecting antibiotics/fungicides based on local susceptibility.

Keywords: Antibiotic, Asepsis, *Chamaecostus subsessilis*, endophytic contamination, In vitro culture, Oxidant

Introduction

Practical and effective measures for the conservation of tropical species are a pressing issue. The survival of plant species faces multiple and complex threats, such as deforestation, climate change, and rampant extraction, which demands the urgent implementation of conservation strategies that include *in situ* and *ex situ* approaches. Long-term *ex situ* conservation of selected species will require living collections, as well as a set of technologies involving expertise in cryobiotechnology, seed biology, plant physiology, tissue culture, plant ecology, and horticulture Pence, et al. (2022). According to Skinner & Milward-de-Azevedo (2018), *ex situ* conservation corresponds to the maintenance of biodiversity outside its natural environments. Due to increasing rates of habitat destruction and species loss, *ex situ* conservation involves the sampling, transfer, and storage of specimens. Silveira et al. (2018) reported that currently, about 21% of known threatened species are conserved *ex situ*, following what was established in Target 8 of the Global Plant Conservation Strategy, which foresees the addition of 75% of threatened species to collections and 20% to ecological restoration programs. Therefore, *ex situ* conservation plays a crucial role in the recovery of rare species, as it is a way of protecting and promoting the growth of endemic plants in Brazil. *In vitro* tissue culture provides a controlled environment (medium, light, temperature, and asepsis) for rapid multiplication and support for *ex situ* conservation. However, micropropagation faces recurring obstacles such as contamination, darkening/oxidation, difficult rooting, acclimatization failures, apical necrosis, recalcitrance, and morphogenic anomalies Abdalla et al. (2022). In recent decades, *in vitro* techniques have become central to the recovery of threatened species and the production of high-quality material Wochok (1981). Over the last few years, *in vitro* culture has emerged as

a powerful tool for the effective propagation of many plant species, allowing the cloning and production of many individuals from a tissue fragment of the mother plant. The potential of these techniques in the recovery of threatened species is immense Wochok (1981).

Contamination is one of the biggest obstacles to in vitro establishment: it reduces explant survival and compromises the quality of the propagated material. It can be external (media, containers, tools, surfaces, handling) or internal (endophytes present in plant tissue). Classic surface disinfection protocols (e.g., sodium hypochlorite, hydrogen peroxide) do not always eliminate internal microorganisms or biofilms; recent studies emphasize adjustments to mother plant pretreatment, disinfectant times/concentrations, and, when necessary, the judicious use of antimicrobials (antibiotics/antifungals) during the establishment phase (Volk et al., 2022; Abdalla et al., 2022). Molecular identification by polymerase chain reaction (PCR) of the internal transcribed spacer region (ITS) and systematic monitoring of cultures have helped to diagnose "silent" contaminations associated with fungal endophytes and to guide more assertive interventions Liao et al. (2025). Brazil is known worldwide for the richness of its biodiversity, particularly its ornamental plants, whose commercial value is still largely unexplored (Almeida & Aki, 1995). Often, the value of native ornamental plants is only recognized when they are studied and improved by other countries. Numerous species possess characteristics suitable for landscaping; however, there is an exhaustive repetition of species that have become established and accepted by the population, many of which are unsuitable for their intended use Leal and Biondi (2006). According to Pires (2008), landscaping is an activity that organizes external spaces with the aim of providing well-being to human beings and meeting their needs, while conserving the

resources of these spaces. The same author emphasizes that the plants used in urban landscaping are important in environmental characterization, as they promote numerous aesthetic and functional benefits to humans and far outweigh their implementation and management costs.

Within the genus *Chamaecostus*, small species with showy inflorescences stand out as having potential for landscaping; established experiences with *Costus spiralis* illustrate its use in tropical gardens and as a cut flower, suggesting a similar opportunity for *C. subsessilis* Kuhlmann et al. (2016). However, the lack of in vitro establishment and micropropagation protocols limits the sustainable exploitation and ex situ conservation of this species.

Given this scenario, this work focuses on the critical barrier of contamination in the in vitro establishment of *Chamaecostus subsessilis*. By testing aseptic procedures and evaluating disinfectant/antimicrobial agents and their effects on the survival and oxidation of explants, the aim is to test protocols for initial establishment of the species, an indispensable step for subsequent micropropagation, acclimatization, and ex situ conservation protocols, as well as future ornamental and landscaping applications.

Materials and Methods

Plant material, asepsis and cultivation

Leaf explants of *Chamaecostus subsessilis* from plants of a native population in the Central-West region of Brazil (Fercal, DF; 15°30'43.98" S; 47°57'50.68" W) were used. The collected plants were transplanted into pots and kept in a greenhouse at CRAD/UnB, with automatic irrigation twice a day (morning and late afternoon). The

leaves were cut at the base, washed with neutral soap and running water, and kept hydrated until asepsis. All subsequent steps were carried out in a laminar flow chamber. The basal disinfection followed the sequence 70% (v/v) alcohol → sodium hypochlorite (NaClO) → mercuric chloride (HgCl₂), with 4 min per step, under agitation, followed by two washes in autoclaved distilled water; the concentrations of NaClO and HgCl₂ varied according to each experiment.

Leaf fragments of approximately 1 cm² were inoculated with the abaxial surface in contact with the medium, in 15 × 90 mm Petri dishes containing approximately 25 mL of MS (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 7 g L⁻¹ agar, 30 g L⁻¹ sucrose, 0.1 g L⁻¹ myo-inositol, and 0.05 g L⁻¹ MS vitamins (Sigma®). The pH was adjusted to 5.7 ± 0.1. The media were autoclaved at 121 °C/20 min/1.5 atm.

The cultures were maintained at approximately 23 °C, in the dark, in a growth chamber, aiming to reduce initial browning/oxidation. In all trials, the percentages of fungal contamination, bacterial contamination, and oxidation/browning of the explants were recorded. The design was completely randomized; the number of replicates, factors, and evaluation times varied according to each experiment. The data were subjected to ANOVA, and the means, when significant, were compared using Tukey's test at 5% (p ≤ 0.05).

In vitro experiments

Experiment 1 — NaClO/HgCl₂. The disinfection sequence included 70% alcohol (fixed), followed by NaClO between 0.2–0.5% and HgCl₂ between 0–0.05%; in T4, HgCl₂ was omitted (control of this factor). The medium was standard MS, without specific additives. The design had 6 replicates per treatment, with 6 explants per replicate. Evaluations occurred 6 days after inoculation, following the protocol of

Bharathi et al. (2022), with some modifications.

Experiment 2 — Cercobin® (immersion). Explants were immersed in 0.2% Cercobin® for 2, 5, or 10 hours and cultured in standard MS (without treatment additives). The design consisted of 6 replicates per treatment. Evaluations were performed at 6 days, following the protocol of Bharathi et al. (2022), with some modifications.

Experiment 3 — Cercobin® (immersion) $\pm$ ampicillin. After immersion in 0.2% Cercobin® (2, 5, or 10 h), the explants were cultured in MS medium with or without ampicillin (500 mg L⁻¹). The design had 3 replicates per treatment. Evaluations were performed at 7 and 30 days, according to the protocol of Bharathi et al. (2022), with certain modifications.

Experiment 4 — Cercobin® (spraying). The mother plants received a 1% Cercobin® spray. In Treatment 1 (7 days), spraying was carried out once a day, in the morning, during the first four days. On the following two days, applications occurred in two periods (morning and afternoon) and, on the last day, in three distinct periods (morning, afternoon and evening).

In Treatment 2 (10 days), spraying was conducted exclusively in the morning during the first seven days, then in two periods (morning and afternoon) on the following two days and, on the last day, in three periods (morning, afternoon and evening). It should be noted that the application times were previously set at 7 am (morning), 12 pm (afternoon) and 5 pm (evening). Explants were cultured in MS supplemented with spectinomycin (150 mg), BAP 2 mg L⁻¹, and kinetin 2 mg L⁻¹. The experimental design included 13 replicates per treatment, with 6 explants per replicate. Evaluations were performed at 7 and 30 days, according to the protocol proposed by Bharathi et al. (2022), with some modifications.

In the last three experiments (5, 6 and 7), the plants were sprayed in the greenhouse, following the same regime established in Treatment 2 of Experiment 4.

Experiment 5 — H₂O₂ (immersion). The explants were immersed in H₂O₂ P.A. between 3–12% for 10 or 20 minutes (without Dioxiplus®) and grown in MS containing spectinomycin (150 mg), 2,4-D 1 mg L⁻¹ and PVP 0.5 mg L⁻¹. The design was 6 replicates per treatment, with 6 explants per replicate. Evaluations took place at 21 days, based on the protocol of Bharathi et al. (2022), with specific modifications.

Experiment 6 — H₂O₂ (immersion) + Dioxiplus®. The immersion scheme in H₂O₂ (3–12%, 10 or 20 min) was maintained, and the medium received, in addition to the additives from Exp. 5, Dioxiplus® 2 mL L⁻¹. The design had 3 repetitions per treatment, with 6 explants per repetition. Evaluations were performed at 21 days, following the protocols of Bharathi et al. (2022) and Rocha et al. (2024), with some modifications.

Experiment 7 — Dioxiplus® in the medium. Without immersion in H₂O₂; The explants were cultured in MS supplemented with spectinomycin (150 mg), 2,4-D 1 mg L⁻¹, PVP 0.5 mg L⁻¹, and Dioxiplus® 2 mL L⁻¹. The design consisted of 10 replicates per treatment, with 6 explants per replicate. Evaluations were performed at 21 days, following the protocols of Bharathi et al. (2022) and Rocha et al. (2024), with some modifications.

Application of historesin for structural characterization of plant tissues

The samples were initially fixed in 50% FAA (formaldehyde, glacial acetic acid, and 50% alcohol) for 12 hours. They were then transferred to 50% ethanol (2 h), 70% ethanol (2 h), 90% ethanol (2 h), and finally 100% ethanol (2 h) for dehydration. The Historesin® kit (Leica) was used for the pre-infiltration and infiltration of the samples. For pre-infiltration, the samples remained for 2 hours in a solution of absolute ethanol:

liquid resin in a 1:1 ratio. For infiltration, they were transferred to 50 mL of liquid resin with the addition of 0.5 g of activator powder (Medium A), remaining for 24 hours. Then, the samples were placed in silicone molds in a transverse orientation using Medium B (15 mL of Medium A + 1 mL of Hardener) for polymerization. Subsequently, the molds were kept in an oven at 40°C until complete polymerization. The blocks containing the samples were fixed in wooden cubes (2×1 cm) using instant adhesive (Super Bonder®). Histological sections were obtained using a Leica RM 2145 rotary microtome, 8 µm thick, stained with Toluidine Blue, and mounted on permanent slides using ERV-MOUNT synthetic resin. The slides were covered with coverslips, left to dry, and subsequently analyzed using an Olympus BX 40 photomicroscope with Image Pro Plus 6.0 software.

Results and Discussion

In Experiment 1, all treatments based on surface asepsis (70% alcohol → 0.2-0.5% NaClO → 0-0.05% HgCl₂) resulted in 100% fungal contamination. This result, while not ideal, is consistent with several recent studies demonstrating that endophytes, microorganisms that live in the internal tissues of plants, represent a significant barrier to the establishment of *in vitro* cultures. These organisms are often not removed by decontamination that acts only on the surface (Reed and Tanprasert, 1995; Ngone et al., 2021; Volk et al., 2022; Şekerli, 2024; Anikina et al., 2025). (2022), for example, discuss cases in which "axenic" *in vitro* cultures show latent contamination even after rigorous surface decontamination, precisely due to the action of internal endophytes that are not eradicated after surface sterilization. Surface protocols frequently fail to

eliminate many of these microorganisms (Anikina et al., 2025).

The effectiveness of surface sterilization is complex and depends on multiple factors, such as the plant species, the type of explant, the origin of the material (field versus nursery), and the previous microbial load (Şekerli 2024; Anikina et al., 2025). The choice of sterilizing agent and the duration of exposure are crucial, as they depend on the characteristics of the explant, with different species and cultivars potentially exhibiting distinct sensitivities to sterilizing agents and exposure time (Anikina et al., 2025). Şekerli (2024), for example, observed that NaOCl alone was ineffective in reducing contamination in hazelnut explants grown in the field.

Given the lack of success of the surface treatments in Experiment 1, it was necessary to implement Experiment 2, in which fungicide and different exposure times were used. In this second aseptic experiment, the persistence of fungal contamination was observed. It was noted that treatment 1, characterized by the shortest exposure time (2 hours) to the fungicide used, resulted in 80.56% fungal contamination, which, although numerically higher, did not differ statistically from the other treatments: 2 (5 hours) and 3 (10 h), which presented averages of 75.0% and 55.56%, respectively. Some plates subjected to treatment 1 showed 100% contamination. Although treatment 3 numerically reduced the percentage of fungal contamination, interestingly, it differed statistically from the other treatments with respect to the percentage of bacterial contamination (88.9%). This result may be due to reduced competition for media components, resulting from a lower rate of fungal contamination. Additionally, it is noteworthy that treatment 3 stood out in terms of simultaneous fungal and bacterial contamination (55.56%). Fungal contamination was characterized by a white coloration. Bacterial contamination presented a milky white appearance. Fungal contamination was observed in all

1 treatments, and although the lowest fungal contamination was recorded, bacterial
2 contamination still persisted.

3 The literature supports this strategy of using fungicides or antibiotics as a complement
4 to surface treatment. Ishibashi et al. (2017), when investigating the in vitro
5 establishment of *Acacia mearnsii*, researched the addition of fungicides, including
6 Cercobin®, to the culture medium to control contamination in explants. The results
7 indicated that the inclusion of fungicides in the culture medium is a viable alternative
8 for the in vitro establishment of explants. Similarly, Da Luz et al. (2024) evaluated
9 different methods of disinfestation in the micropropagation of nodal segments of *Ocotea*
10 *odorifera*. The most effective treatment for controlling fungal contamination was
11 immersion in Cercobin®, followed by immersion in a 0.05% HgCl₂ solution, resulting
12 in only 8% fungal contamination.

13 Anikina et al. (2025), on the other hand, emphasize that conventional chemical methods
14 (alcohol, hypochlorite, HgCl₂) are often insufficient against internal or latent
15 contamination, and that fungicides/antibiotics and agents with systemic or internal
16 activity are necessary, especially for native or highly contaminated material.

17 Simões et al. (2024), working with the in vitro establishment of adult leaves of
18 *Melanoxylon brauna*, observed that explants from leaves of trees of this species showed
19 100% contamination and oxidation in 15 days. This indicates that the use of NaClO and
20 the fungicide Cercobin® alone, at the concentrations and exposure times tested, was not
21 effective for decontamination. Thus, the use of an antibiotic to control bacterial
22 contamination is recommended. According to Pereira et al. (2014), the use of alcohol
23 and hypochlorite is usually efficient in controlling fungal contamination. Thus,
24 depending on the type of explant, immersion in amoxicillin (antibiotic) may be

necessary to avoid bacterial contamination present in the explants (Handa; Sampaio; Quisen, 2005).

Palú et al. (2011), in studies on the addition of antibiotics for the control of endogenous bacteria in the micropropagation of *Ficus carica*, observed that the inclusion of antibiotics in the culture medium was essential for controlling bacterial contamination in apical buds of fig trees. Furthermore, sodium ampicillin, at a concentration of 250 mg L⁻¹, was effective in inhibiting bacterial growth in vitro after inoculation of apical buds, resulting in a survival rate greater than 90% for the explants.

Pereira et al. (2014) investigated the use of sodium ampicillin and chloramphenicol in controlling contaminants during micropropagation of *Musa acuminata*. The results demonstrated that, at a concentration of 20 mg L⁻¹, both antibiotics were effective in reducing fungal and bacterial contamination by up to 70%, without causing significant damage to the explants.

In Experiment 3, asepsis by immersion in Cercobin® for 2, 5, or 10 h, in the presence or absence of ampicillin (500 mg L⁻¹), resulted in numerical variations in contamination rates at 7 and 30 days, but without statistically significant differences for fungal, bacterial, fungal + bacterial, or oxidation contamination (main effects and interaction). For fungal contamination, only a trend of effect of the immersion time factor in Cercobin® was observed, without reaching significance. Descriptively, without antibiotic, in treatment T1 (2 h), 16.67% fungal contamination was recorded at 7 days, increasing to 27.78% at 30 days. T2 (5 h) remained free of fungal and bacterial contamination until the seventh day; however, at 30 days, it presented 33.33% fungal contamination and 11.11% bacterial contamination. Treatment T3 (10 h) showed 38.89% fungal contamination at 7 days, rising to 66.67% at 30 days, while bacterial

contamination was detected in 5.56% of the samples during this period. In all treatments without the addition of ampicillin, bacterial contamination was observed at 30 days. In the presence of the antibiotic, T1 showed an increase from 27.78% to 66.67% in fungal contamination between 7 and 30 days, with no records of bacterial contamination. T2 started without contamination and reached 11.11% fungal infection at 30 days, being the only one to show bacterial contamination during this period. T3, in turn, maintained similar percentages of fungal contamination in the two evaluated intervals and did not show bacterial contamination (Table 1).

In addition to fungal and bacterial contamination, the occurrence of simultaneous fungal and bacterial contamination and explant oxidation was evaluated. Analysis of variance did not indicate statistically significant differences between treatments or as a function of ampicillin addition ($p > 0.05$ for all factors and interactions). Descriptively, the levels of simultaneous fungal and bacterial contamination were low in all treatments, not exceeding 5.56% in the 7- and 30-day evaluations, regardless of antibiotic use. Similarly, oxidation showed reduced incidences and was randomly distributed among treatments, without indicating any pattern associated with immersion time in Cercobin® or the presence of ampicillin. These results reinforce that, in Experiment 3, the main barrier continued to be isolated fungal contamination, while bacterial contamination, simultaneous fungal and bacterial contamination, and oxidation played a secondary and low-frequency role.

Despite the lack of statistical significance, it is noteworthy that, in general terms, the contamination rates in Experiment 3 were lower than those observed in Experiments 1 and 2. This difference may be related to the fact that, in the third trial, the leaves used were collected from plants whose aerial parts had already senescent. Under these

conditions, the previous environmental stress is reduced and the microbial load tends to be lower, unlike plants collected directly from the natural environment (Experiments 1 and 2), which probably brought with them endemic and more resistant microorganisms from their environment of origin. Previous studies have already highlighted that mother plants from the field exhibit higher levels of contamination, while material from a protected nursery or greenhouse presents lower initial loads, facilitating in vitro establishment (Niedz and Bausher, 2002; Rathore et al., 2015; Şekerli et al., 2024). Similar observations have been made in tropical and woody systems, in which the physiological condition of the donor plant strongly influences endophyte colonization rates (Ngone et al., 2021; Volk et al., 2022).

According to Medeiros (1999), contamination levels tend to be higher when the mother plants used as a source of explants come from the field. However, even plants subjected to rigorous phytosanitary control and kept in protected nurseries or greenhouses can be potential sources of microorganisms, which can limit in vitro cultivation procedures.

Erig and Schurch (2005), when studying the in vitro establishment of blueberry from nodal segments, observed an absence of bacterial and oxidation contamination, while fungal contamination was only 1.36%. This result is probably attributed to maintaining the mother plants in clean and protected environments (greenhouse), as well as prior spraying with antibiotics and fungicides.

Regarding Experiment 4, spraying with Cercobin® affected the evaluated parameters in distinct ways. After 7 days of in vitro culture, significant differences were observed in fungal contamination ($p < 0.01$), with higher values in treatment T2 (10 days) compared to T1 (7 days) and the control. Oxidation was also influenced ($p < 0.05$), being higher in T2 than in T1, although without differences compared to the control. Bacterial

contamination and yellowing did not show statistically significant variations between treatments, remaining at similar levels.

After 30 days of evaluation, fungal contamination remained high in all treatments, but with clear differences: T3 (control) and T1 showed the highest averages (100% and 88.9%, respectively), while T2 showed a significant reduction (41.7%). The same pattern was observed for oxidation, with T3 showing the highest values (100%), followed by T2 (75%) and T1 (61.1%), although only T1 differed statistically from the others. Yellowing, on the other hand, remained low in all treatments, without significant differences.

In Experiment 4, pre-spraying of mother plants with Cercobin® 1% (methyl thiophanate, systemic benzimidazole) for 7 days (T1) or 10 days (T2) preceded the cultivation of explants in MS + spectinomycin (150 mg L⁻¹) + BAP (2 mg L⁻¹) + kinetin (2 mg L⁻¹). At seven days, higher levels of fungal contamination and oxidation were observed in T1 compared to T2 and, in part, to the control, suggesting a favorable initial effect of the longer regime. However, after 30 days, contamination increased in both treatments, with T2 showing the lowest incidence (41.7%), while T1 (88.9%) and the control (100%) remained at high levels, suggesting a late benefit of pre-conditioning with fungicide (Table 2). This behavior is plausible for systemic benzimidazoles: thiophanate methyl is translocated within the plant and converted to carbendazim, prolonging protection and conferring protective/curative action after a period of translocation and metabolic activation. Review studies, such as Bai et al. (2024), reinforce this systemic mode of action and the contribution of carbendazim to residual antifungal activity.

The initial peak of oxidation and the higher contamination at T2 to 7 may reflect

1 physiological stress of the tissue and a transient increase in phenols, which are known to
2 favor browning/necrosis and greater susceptibility to microbial colonization. In tissue
3 culture, the production and oxidation of phenolic compounds is a classic obstacle to
4 establishment and can be modulated by pretreatment conditions and the composition of
5 the medium (antioxidants, adsorbents, regulators) (Abdalla et al., 2022), a scenario
6 consistent with that observed here.

7 The superior performance of T2 at 30 days is consistent with reports that mother plant
8 management strategies (e.g., preventative spraying, protected environment) reduce the
9 initial load and delay the emergence of contaminants, although they do not eliminate
10 endophytes, which may re-emerge over time. Recent reviews emphasize that surface
11 aseptic protocols often fail against internal endophytes and that combined approaches
12 (pre-management + antimicrobials in the medium) are often necessary. The literature
13 also records the use of broad-spectrum biocides during establishment (e.g., PPM™) as
14 additional support when well-calibrated to the species (Volk et al., 2022; Romadanova
15 et al., 2022).

16 In summary, spraying with thiophanate-methyl for 10 days (T2) does not consistently
17 improve initial parameters (7 days), but shows a clear advantage in late fungal control
18 (30 days). To maximize the gain at T2 without incurring the initial oxidation peak, the
19 logical step is to test fine adjustments (dose/interval) and combinations with
20 phenol/stress mitigators (antioxidants/adsorbents in the medium) and with
21 antimicrobials whose spectrum is compatible with the local endophytic microbiota,
22 maintaining monitoring in subcultures to capture late re-emergence (Abdalla et al.,
23 2022; Volk et al., 2022).

24 In this experiment, spraying the mother plants with Cercobin® 1% for 7 days (T1) or 10

days (T2) preceded the introduction of explants into MS + spectinomycin (150 mg L⁻¹) + BAP (2 mg L⁻¹) + kinetin (2 mg L⁻¹). Cercobin® is a systemic benzimidazole fungicide (active ingredient: thiabendazole methyl), used preventively and capable of providing protection "from the inside out" of the leaf; therefore, it makes sense that longer spraying regimes reduce the initial fungal inoculum reaching the crop, especially when the source is field material. T2 (10 days) showed lower fungal contamination at 30 days, suggesting a quantitative benefit of preconditioning with fungicide, although this does not eliminate the possibility of endophyte re-emergence during cultivation, a recurring phenomenon described for materials originating from the field/greenhouse and for germplasm bank accessions. In parallel, the establishment medium included spectinomycin, an antibiotic whose primary target in plant cells is plastid translation; it is useful as a selective agent, but it is not a broad antibacterial "blanket" against endophytes and can even induce chlorosis/chloroplast effects when the dose or time is not calibrated to the species, which helps explain the persistence of late contaminations even in the presence of the antibiotic. In summary, the results are consistent with (i) the prophylactic role of systemic benzimidazoles in reducing the initial fungal load and (ii) the long-term resilience of endophytic communities, recommending combining prior management of the mother plant (preventive spraying for a longer period) with internal strategies in the medium (antimicrobials suitable for the local spectrum) and monitoring throughout the subcultures.

In Experiment 4, Treatment 2, at 60 days, the formation of a creamy-yellowish mass with a rough/convoluted surface was recorded at the edge of the leaf explant. Observation under a stereomicroscope (Leica M205C) suggested the possibility of callus formation; however, the anatomical section and photomicrograph showed hyphae

and organization typical of mycelial growth, ruling out callus tissue. The observed morphology is compatible with descriptions of fungal colonies in culture media, frequently white to cream/yellowish, with a flocculent/velvety texture and rough surface, sometimes with a yellowish reverse, characteristics documented for several taxa (e.g., *Penicillium*, *Trichoderma*) in potato culture medium with glucose and malt culture medium (Houbraken et al., 2016; Crous et al., 2017). The late occurrence (60 days) is consistent with the emergence of endophytes during prolonged cultivation, even when the initial establishment appears free of microorganisms, a behavior described for endophytic fungi in different systems Volk et al. (2022).

In Experiment 5, immersion in H₂O₂ for 10 min led to 100% fungal contamination at all concentrations tested (3%, 6%, 9%, and 12%), indicating that the initial exposure window was insufficient to contain the inoculum. Extending the exposure to 20 min resulted in only a slight reduction in the 3% group ($91.7 \pm 8.3\%$), while the 6%, 9%, and 12% groups remained at 100%, suggesting that, in their material, H₂O₂ acted as a contact agent with a limited effect against the endophytic load. These results differ from those reported by Ahmadpoor et al. (2022), who, when working with *Melia azedarach* L., observed that pre-treatment of explants with benomyl (2 g/L for 2 hours), followed by sterilization with 7% H₂O₂ for 10 minutes and 2% NaOCl (without pH adjustment) for 12 minutes, significantly reduced contamination and darkening rates, in addition to favouring callus induction and growth. This discrepancy suggests that the effectiveness of H₂O₂ may depend not only on the concentration and exposure time, but also on its association with other disinfecting agents, such as systemic fungicides (e.g., benomyl) and the use of NaOCl for longer exposure times, in addition to the physiological and anatomical particularities of each plant species.

In Experiment 6, conducted in MS medium supplemented with Dioxiplus® and 2,4-D, it was found that, regardless of the exposure time (10 or 20 minutes) and the H₂O₂ concentrations tested (3%, 6%, 9%, and 12%), all treatments showed 100% fungal contamination. These results demonstrate that, under the evaluated conditions, the addition of Dioxiplus® did not contribute to the reduction of contamination. In contrast, Hesami et al. (2019), working with ornamental *Chrysanthemum morifolium*, observed that treatment with 12% H₂O₂ for 15 minutes of immersion promoted a low contamination rate and high viability of the explants, showing that the response to the use of peroxide may vary according to the species and the protocol employed.

In Experiment 7, conducted with the addition of Dioxiplus®, all replicates showed 100% fungal contamination, demonstrating the product's ineffectiveness in controlling fungi under the evaluated conditions. This result contrasts with the observations of Rocha et al. (2024), who, using MS medium supplemented with Dioxiplus® and different concentrations of 2,4-D (0, 2, 4, and 8 mg L⁻¹), observed differentiated responses according to the type of explant. In *Dipteryx odorata*, only the concentration of 8 mg L⁻¹ promoted callus formation in leaf segments (8% induction), while in cotyledon segments the same concentration resulted in 25% induction, demonstrating a greater potential for response in this type of explant compared to leaves. Thus, the results obtained suggest that, for *Chamaecostus subsessilis*, the concentration of 2,4-D should be readjusted from 1 mg L⁻¹ to 8 mg L⁻¹, in order to favour callus induction in leaf explants.

Optimization of aseptic protocols should integrate complementary strategies: preconditioning of mother plants in protected environments (nursery/greenhouse), judicious use of broad-spectrum biocides incorporated into the medium (e.g., PPM™),

1 and screening of antibiotics and fungicides according to the susceptibility of local
2 isolates (Niedz & Bausher, 2002; Volk et al., 2022). The use of young meristems,
3 associated with mild thermotherapy and antioxidants in the initial cultivation, can
4 significantly reduce contamination rates. These adjustments are crucial to enable the
5 aseptic introduction of the species and allow progression to the multiplication and
6 rooting phases, key steps to consolidate an efficient *in vitro* conservation and
7 propagation protocol.

8 Our results offer evidence and practical guidelines to overcome obstacles to the *in vitro*
9 establishment of *C. subsessilis*.

11 **Acknowledgments**

12 The authors would like to thank the Reference Center for Nature Conservation in
13 Degraded Areas (CRAD, UnB), where experiments were conducted.

15 **Authors' Contributions**

16 F.R.S.E.S was responsible for the study design, data collection, and initial drafting of
17 the manuscript. I.M.A.S.C. contributed to study design and interpretation of the results.
18 T.A. contributed to study design and interpretation of the results. All authors
19 participated in
20 the critical revision of the intellectual content and formatting of the manuscript. All
21 authors read and approved the final version of the manuscript.

23 **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest related to the publication of this manuscript.

Data Availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study will be available in the Scielo Data repository.

References

- Abdalla N, El-Ramady H, Seliem MK, El-Mahrouk ME, Taha N, Bayoumi Y, Shalaby TA, et al. 2022. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae* 8(8): 677. DOI: 10.3390/horticulturae8080677
- Abdalla N, Mahmoud MA, Ali AA, Hesami M. 2022. Machine learning for in vitro plant tissue culture: applications and perspectives. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 149: 1–18. DOI: 10.1007/s11240-022-02306-9
- Almeida FRF, Aki AY. 1995. Grande crescimento no mercado das flores. *Agroanalysis* (Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas) p. 8–11
- Ahmadpoor F, Zare N, Asghari R, Sheikhzadeh P. 2022. Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolite production in *in vitro* cultures of *Melia azedarach* L. *AMB Express* 12(1): 3. DOI: 10.1186/s13568-022-01343-8
- Anikina I, Kaynidenov N, Turista DDR, Kukusheva A, Tokbergenova Z, Tuganova B, et al. 2025. Control of contamination of tissue plant cultures during *in vitro* clonal micropropagation. *OnLine Journal of Biological Sciences* 25(2): 333–342. DOI: 10.3844/ojbsci.2025.333.342

- 1 Bai X, Dag D, Jung J, Zhao Y. 2024. Investigation of antioxidant edible coating and
2 modified atmosphere packaging for enhancing storability of hazelnut kernels. *Journal of*
3 *Agriculture and Food Research* 17: 101246. DOI: 10.1016/j.jafr.2024.101246
- 4 Bamba B., Neubert K., Wetzel A., Etienne H., Häberle K.H., Lieberei R. 2021.
5 Automated temporary immersion system for efficient coffee somatic embryogenesis.
6 *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 146: 313–326. DOI: 10.1007/s11240-
7 021-02080-8
- 8 Bharathi J.K., Anandan R., Rameshkumar S., Menaka K., Prakash M.A.S. 2022.
9 Development of an efficient in vitro regeneration system in *Costus speciosus* – an
10 important herbal insulin plant. *South African Journal of Botany* 149: 468–475. DOI:
11 10.1016/j.sajb.2022.06.010
- 12 Crous P.W., Wingfield M.J., Burgess T.I., Hardy G.E.S.J., Gené J., Gomes R.R., et al.
13 2017. Fungal Planet description sheets: 558–624. *Persoonia: Molecular Phylogeny and*
14 *Evolution of Fungi* 38: 240–384. DOI: 10.3767/persoonia.2017.38.09
- 15 Da Luz S.C.S., Pereira J.R., Ribas L.L.F., de Alcantara G.B., Koehler H.S., Zuffellato-
16 Ribas K.C. 2024. Diferentes tratamentos de desinfestação *in vitro* na micropropagação
17 de segmentos nodais de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). *Revista*
18 *Delos* 17(54): e1411. DOI: 10.55905/rdelosv17.n54-025
- 19 Erig A.C., Schuch M.W. 2005. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos
20 nodais. *Scientia Agraria* 6(1–2): 91–96.
- 21 Handa L., Sampaio P.T.B., Quisen R.C. 2005. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas
22 de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica* 35(1): 29–33. DOI:
23 10.1590/S0044-59672005000100005
- 24 Hesami M., Daneshvar M.H., Yoonsee M., Alizadeh M. 2019. Modeling and optimizing

- 1 *in vitro* sterilization of chrysanthemum using artificial neural network and genetic
2 algorithm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 139: 599–611. DOI:
3 10.1007/s11240-019-01654-6
- 4 Houbraken J., Vismara P., Meijer M., Frisvad J.C., Samson R.A. 2016. A taxonomic
5 and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*
6 85: 1–36. DOI: 10.1016/j.simyco.2016.11.005
- 7 Ishibashi V., Koguta K.V., Junior P.C.F., Higa A.R. 2017. Estabelecimento *in vitro* de
8 *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). *Plant Cell Culture & Micropropagation* 13(1):
9 15–21
- 10 Kuhlmann M., Vieira R., Camillo J., Pareyn F.G.C. 2016. *Costus spiralis* (Cana-do-
11 brejo). In: Vieira R., Camillo J., Pareyn F.G.C. (eds.) *Espécies nativas da flora*
12 *brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região*
13 *Centro-Oeste*. Brasília, Ministério do Meio Ambiente
- 14 Leal L., Biondi D. 2006. Potencial ornamental de espécies nativas. *Revista Científica*
15 *Eletrônica de Engenharia Florestal* 4(8): 1–16.
- 16 Liao C., Doilom M., Jeewon R., Hyde K.D., Manawasinghe I.S., Chethana K.W.T., *et*
17 *al.* 2025. Challenges and update on fungal endophytes: classification, definition,
18 diversity, ecology, evolution and functions. *Fungal Diversity* 131: 301–367. DOI:
19 10.1007/s13225-025-00550-5
- 20 Medeiros C.P.C. 1999. Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas em explantes
21 nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade
22 Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil
- 23 Niedz R.P., Bausher M.G. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from
24 greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*

- 1 38(5): 468–471.
- 2 Palú E.G., Corrêa L.D.S., Suzuki A.N., Boliani A.C. 2011. Uso de antibióticos para o
3 controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. *Revista*
4 *Brasileira de Fruticultura* 33: 587–592.
- 5 Pence V.C., Meyer A., Linsky J., Gratzfeld J., Pritchard H.W., Westwood M., et al.
6 2022. Defining exceptional species—A conceptual framework to expand and advance
7 ex situ conservation of plant diversity beyond conventional seed banking. *Biological*
8 *Conservation* 266: 109440. DOI: 10.1016/j.biocon.2021.109440
- 9 Pereira G.A., Boliani A.C., Furlani Junior E. 2014. Uso da ampicilina sódica e
10 cloranfenicol no controle de contaminantes na micropropagação de bananeira ‘Thap
11 Maeo’. *Revista Ceres* 61(3): 299–305. DOI: 10.1590/0034-737X201461030001
- 12 Pires L.L. 2008. *Paisagismo e plantas ornamentais*. Goiânia, Universidade Federal de
13 Goiás. Apostila de Paisagismo – UFGO.
- 14 Rathore JS, Rai MK, Phulwaria M. 2014. A liquid culture system for improved
15 micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. *indica* and ex vitro rooting.
16 *Proceedings of the National Academy of Sciences, India - Section B: Biological*
17 *Sciences* 84: 193–200. DOI: 10.1007/s40011-013-0204-8.
- 18 Reed BM, Tanprastsert P. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of
19 plant tissue cultures: a review of recent literature. *Plant Tissue Culture and*
20 *Biotechnology* 1(3): 137–142.
- 21 Romadanova NV, Zhuravlev YN, Gabidullina NV, Yakovleva OV, Glagolyeva YA.
22 2022. Effect of plant growth regulators on callus formation and somatic embryogenesis
23 in *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *Russian Journal of Plant Physiology* 69(3): 580–588.
24 DOI: 10.1134/S1021443722030178.

- 1 Rocha T.T., Paiva R., Souza A.R., Silva B.T.S., Friedrich H.A., Brito I.C., et al.
2 2024. Diferentes explantes e reguladores de crescimento na indução de calos em
3 *Dipteryx odorata* (Aubl.) Forsyth F. Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas,
4 Agrárias e da Saúde 28(1): 12–16. DOI: 10.17921/1415-6938.2024v28n1p12-16.
- 5 Şekerli M. 2024. Season, thermotherapy and surface sterilization play important roles in
6 microbial contamination of hazelnut in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ*
7 *Culture* 157: 70. DOI: 10.1007/s11240-024-02799-1.
- 8 Silveira F.A.O., Teixido A.L., Zanetti M., Pádua J.G., Andrade A.C.S., Costa M.L.N.
9 2018. Ex situ conservation of threatened plants in Brazil: a strategic plan to achieve
10 Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation. *Rodriguésia* 69(4): 1547–1555.
11 DOI: 10.1590/2175-7860201869405.
- 12 Simões I.M., de Carvalho S.W.S., Silva J., Costa D.P.F., Lopes J.C., Sobreira R.
13 Estabelecimento in vitro de folhas de plantas adultas de *Melanoxylon braúna*.
- 14 Volk G.M., Heslop-Harrison P., Heredia A., Wang M.R., Dumet D. 2022. Ex situ plant
15 cryopreservation: progress and prospects. *Plants* 11(18): 2384.
- 16 Skinner L.F., Milward-de-Azevedo M.A. 2018. Conservação in situ e ex situ da
17 biodiversidade brasileira. *Diversidade e Gestão* 2(2): 47–51.
- 18 Wochok Z.S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered
19 plant species. *Biological Conservation* 20: 83–89.

Table Captions

Table 1. Percentage of contamination (fungi and bacteria) in leaf explants of *Chamaecostus subsessilis* introduced in vitro in Experiment 3, with and without the addition of antibiotic (ampicillin), at 7 and 30 days of culture. Values expressed as mean $\pm$ standard error.

Condition	Treatments	Fungal (7d)	Fungal (30d)	Bacterial (7d)	Bacterial (30d)
Without Antibiotic	T1 (2h)	16,67 $\pm$ 9,62	27,78 $\pm$ 27,78	0,00 $\pm$ 0,00	5,56 $\pm$ 5,56
	T2 (5h)	0,00 $\pm$ 0,00	33,33 $\pm$ 33,33	0,00 $\pm$ 0,00	11,11 $\pm$ 5,56
	T3 (10h)	38,89 $\pm$ 24,22	66,67 $\pm$ 33,33	0,00 $\pm$ 0,00	5,56 $\pm$ 5,56
Without Antibiotic	T1 (2h)	27,78 $\pm$ 20,03	66,67 $\pm$ 33,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	T2 (5h)	0,00 $\pm$ 0,00	11,11 $\pm$ 5,56	0,00 $\pm$ 0,00	5,56 $\pm$ 5,56
	T3 (10h)	5,56 $\pm$ 5,56	5,56 $\pm$ 5,56	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,01

Table 2. Means ($\pm$ standard error) of fungal and bacterial contamination, oxidation, and yellowing in leaf explants of *Chamaecostus subsessilis* (Experiment 3) obtained from parent plants sprayed with Cercobin® (1%) for 7 days (T1), 10 days (T2), or without application (T3, control). Evaluations performed at 7 and 30 days of cultivation in MS medium supplemented with spectinomycin (150 mg L⁻¹), BAP (2 mg L⁻¹), and kinetin (2 mg L⁻¹). Values expressed as percentage of affected explants. Different letters indicate significant differences between treatments by Tukey's test ($p < 0.05$).

Evaluation	Treatments	Fungal Contamination (%)	Bacterial Contamination (%)	Fungal and Bacterial Contamination (%)	Oxidation (%)	Yellowing (%)	Oxidation and Yellowing (%)
7th day	T1 (7d)	72,22±13,83 a	30,56±14,54 a	30,56±14,54 a	47,22±10,90 a	77,78±15,91 a	47,22±10,90 a
	T2 (10d)	16,67±16,67 b	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	11,11±11,11 a	16,67±16,67 a	11,11±11,11 a
	T3 (control)	80,56±10,02 a	22,22±14,06 a	22,22±14,02 a	30,56±11,72 b	44,45±15,31 a	27,78±12,67 a
30th day	T1 (7d)	88,89±5,56 a	—	—	61,11±12,67 a	2,78±2,78 a	—
	T2 (10d)	41,67±20,07 b	—	—	75,00±11,18 ab	2,78±2,78 a	—
	T3 (control)	100,00±0,00 a	—	—	100,00±0,00 a	0,00±0,00 a	—