UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
Departamanento de Tecnologia e Ciências Sociais – Campus III

ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Hylocereus costaricensis*

Marianna Hipólito Rocha

Juazeiro - BA
2022

DTCS - CAMPUS III
Departamento de Tecnologia
e Ciências Sociais

UNEB
UNIVERSIDADE DO
ESTADO DA BAHIA

MARIANNA HIPÓLITO ROCHA

ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Hylocereus costaricensis*

Monografia apresentada ao Colegiado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia – UNEB – *Campus III*, como requisito parcial para avaliação do Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: André Luís Lopes da Silva

Juazeiro - BA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Regivaldo José da Silva/CRB-5-1169

R672e Rocha, Marianna Hipólito

Esterilização química na multiplicação in vitro de Hylocereus costaricensis / Marianna Hipólito Rocha. Juazeiro-BA, 2022.

40 fls.: il.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Lopes da Silva.
Inclui Referências
TCC (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. Campus III. 2022.

1. Pitaya. 2. Pitaya – Cultura de Tecidos. 3. Pitaya – Esterilização. I. Silva, André Luís Lopes da. II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. III. Título.

CDD: 634.4

MARIANNA HIPÓLITO ROCHA

ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PITAYA

(*Hylocereus costaricensis*)

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade do Estado da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Aprovado em: 13 / 07 / 22

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luís Lopes da Silva (Orientador)

Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Profª.Drª. Joselita Cardoso de Souza

Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Profª.Drª. Lindete Miria Vieira Martins

Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Juazeiro – BA

2022

AGRADECIMENTOS

Durante esses anos de graduação, aprendi não só sobre Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, mas também lições de vida. Aprendi a selecionar amizades, lugares, a respeitar o meu processo e as minhas limitações. Em suma, descobri que o meu potencial vai muito além do que qualquer um pode imaginar.

Agradeço à Deus pela dom da vida e por estar sempre comigo. A minha querida avó, Maria das Graças Hipólito Lopes, sem você mãezinha nada disso seria possível, obrigada por ter feito sempre mais do que poderia.

Ao meu parceiro de caminhada, Diego Marcel Silva Menezes, pela sua contribuição e empenho para minha formação profissional e ao meu filho, Samuel Hipólito R. De Menezes, por ser a minha fonte inesgotável de amor.

Agradeço também, a todos os meus familiares e amigos que contribuíram com a minha formação. Em especial a minha mãe Francisleide Magda Hipólito Lopes, por me dar a certeza que nunca estarei só.

As minhas tias Keilla e Josenilda e ao meu tio José Erwin pelo empenho para me ver trilhar o caminho dos estudos.

Ao meu orientador André Luis Lopes da Silva, por toda paciência e dedicação, também a professora Joselita, por todo carinho e educação em sanar minhas dúvidas.

As minhas colegas de laboratório Liezely e Fernanda, por todo apoio, por me incentivarem e por acreditarem no meu potencial.

Também as minhas colegas de turma Luany e Lorena pelos conhecimentos partilhados.

Ao querido Alessandro, que foi essencial para me auxiliar nessa pesquisa, me ajudando sempre que solicitei.

A todos que participaram direta ou indiretamente para realização dessa conquista. O mérito é nosso!

RESUMO

A propagação *in vitro* é um mecanismo que necessita de controles rigorosos para que não haja contaminaçoões, nesse sentido a esterilização térmica é popularmente usada para esse fim, no entanto os custos decorrentes da aquisição e manutenção desse equipamento encarecem esse processo. Desse modo, essa pesquisa objetivou uma alternativa com menor valor econômico e que seja tão eficiente quanto a esterilização térmica, avaliando a eficiência e a concentração ideal de hipoclorito de sódio para esterilização de meios de cultura e vidrarias utilizadas na multiplicação de *Hylocereus costaricensis*, sem que comprometa o desenvolvimento da planta. Para isso, foi realizado um experimento com cinco tratamentos, sendo tratamento I (controle I, esterilizado termicamente), tratamento II (controle II, sem nenhum tipo de esterilização), tratamento III (utilizando apenas água autoclavada para diluição do meio nutritivo, sem mais nenhum tipo de esterilização), tratamento IV (concentração de cloro ativo de 0,001%) e tratamento V (concentração de cloro ativo de 0,003%). O comportamento das plantas foi avaliado com base no comprimento da parte aérea e raízes, número de raízes, número de brotos, percentual de hiperidricidade, presença ou ausência de calos e contaminação. Os resultados mostraram que a adição de uma concentração de cloro ativo de 0,003% aos meios de cultura proporcionou controle dos contaminantes, não havendo diferenças significativas em relação às variáveis analisadas entre as plantas obtidas com esterilização térmica e com esterilização com hipoclorito de sódio. Assim, a esterilização química pode ser utilizada em substituição à esterilização térmica de meios de nutrição para multiplicação de *H. costaricensis in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Hipoclorito de sódio (NaOCl); cultura de tecidos; contaminação; autoclave; redução de custos.

ABSTRACT

In vitro propagation is a mechanism that requires strict controls so that there is no contamination, in this sense thermal sterilization is popularly used for this purpose, however the costs resulting from the acquisition and maintenance of this equipment make this process more expensive. Thus, this research aimed at an alternative with lower economic value and that is as efficient as thermal sterilization, evaluating the efficiency and the ideal concentration of sodium hypochlorite for the sterilization of culture media and glassware used in the multiplication of *Hylocereus costaricensis*, without compromise the plant's development. For this, an experiment was carried out with five treatments, being treatment I (control I, thermally sterilized), treatment II (control II, without any type of sterilization), treatment III (using only autoclaved water to dilute the nutrient medium, without further no type of sterilization), IV treatment (0.001% active chlorine concentration) and V treatment (0.003% active chlorine concentration). Plant behavior was evaluated based on shoot and root length, number of roots, number of shoots, percentage of hyperhydricity, presence or absence of calluses and contamination. The results showed that the addition of an active chlorine concentration of 0.003% to the culture media provided control of the contaminants, with no significant differences in relation to the variables analyzed between the plants obtained with thermal sterilization and with sterilization with sodium hypochlorite. Thus, chemical sterilization can be used to replace the thermal sterilization of nutrition media for the multiplication of *H. costaricensis in vitro.*

KEYWORDS: Sodium hypochlorite (NaOCl); tissue culture; contamination; autoclave; cost reduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pomar de pitaya sob o método de tutoramento Fonte: Pixabay.....17

Figura 2. Flor de Hylocereus Undatus Fonte: Pixabay 17

***Figura 3**. Diferenças de cores de polpa entre a H. Costariensis (á direita) e H. Undatus (á esquerda) Fonte: Pixabay*.....18

Figura 4. Suco de pitaya Fonte: Pixabay.....21

Figura 5. Todos os tratamentos apresentaram formação de calos. (a) tratamento controle; (b) tratamento com 0,001% de NaClO;(c) tratamento com 0,003%. 31

Figura 6. Controle II após 24 horas. Fonte: autoria própria 32

Figura 7. Contaminação do controle III. Fonte: autoria própia.....33

Figura 8. Contaminação do tratamento I ao 11º dia de cultivo. Fonte: autoria própria 33

Figura 9. Todos os tratamentos apresentaram hiperidricidade. Fonte: autoria própria 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Ácido α-naftalenoacético
BAP	6-Benzilaminopurina
NaClO	Hipoclorito de sódio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Kc	Coeficiente da cultura
®	marca comercial registrada
MS	meio de cultura desenvolvido por Murashige e Skoog, em 1962

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças entre os tratamentos sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio aos 60 dias de cultivo. Universidade do Estado da Bahia, 2022. 30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **12**

2. REVISÃO DE LITERATURA **15**

2.1 Pitaya ***15***

2.2 Hylocereus costaricensis ***20***

2.3 Meios de propagação da pitaya ***21***

2.4 Cultura de tecidos ***23***

2.5 Formas de esterilização em cultura de tecidos ***24***

2.6 Esterilização química com hipoclorito de sódio (NaClO) ***25***

3. MATERIAIS E MÉTODOS **27**

3.1. Local do experimento ***27***

3.2. Material vegetativo ***27***

3.3 Meios de cultura e introdução dos explantes ***27***

3.5 Avaliação dos parâmetros ***29***

3.6 Análise estatística ***29***

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES **30**

5. CONCLUSÕES **36**

REFERÊNCIAS **37**

1. INTRODUÇÃO

As pitayas são popularmente chamadas de Frutas do dragão, são pertecentes ao gênero *Hylocereus*, a família Cactaceae e a ordem Caryophyllales, contém 1.500 espécies nativas das Américas, trata-se de uma cactácea de clima subtropical, atualmente produzida em quase todo o mundo, principalmente em regiões áridas, semi áridas, tropicais e subtropicais. No Brasil, esses frutos possuem um alto valor econômico, principalmente, por se tratar de um vegetal exótico, com altas propriedades organolépticas e sensoriais (MOREIRA et al**.**, 2017).

Dentre as diversas espécies de Pitaya como a *Selenicereus undatus, Selenicereus setaceus*, *Selenicereus megalanthus* destaca-se a *Hylocereus Costaricensis* que é uma variedade de casca e polpa vermelha, com altos índices de antioxidantes, isso justifica-se pelo alto teor de betalaína presente, sabe-se que a cor vermelha da polpa se dá pela presença de compostos tais como: betalaínas, betacianinas vermelho-violeta, betaxantaninas, entre outros. Dessa forma, é visto o potencial dessa fruta tanto por suas propriedades nutracêuticas quanto para extração desses corantes (RORIZ et al., 2022).

Com isso além desse elevado teor nutricional, esse fruto também é reportado reduzindo índices de colesterol, diabetes, além de neutralizar alguns metais pesados (XI, X. et al.,2019). Diante dessas evidências, a indústria alimentícia tem inserido cada vez mais a Pitaya em seus processos, assim ja está sendo utilizada em doces, sorvetes, iogurtes, geléias, entre outros (WINSON et al., 2020).

Também, as flores dessa planta ganharam destaque devido a sua exuberância, colocando essa espécie no grupo de plantas ornamentais (XI, X. et al.,2019).

Não obstante essa planta é autopolinizadora e possui menor porcentagem de pega devido ao seu maior estigma, possuem também hastes triangulares e requerem uma treliça para escalar, sendo assim necessário meios de propagação eficientes que atendam as demandas do mercado e que garantam lucros aos produtores, visto que os meios convencionais que vem sendo utilizados como propagação por sementes, estaquia e enxertia são meios suscetíveis a contaminação, além de insuficientes para produções comerciais devido à falta de

nós jovens e também apresentam expansão genética, que para comercialização de frutos não é um bom indicativo, já que espera-se ter uma homegeneidade desses, preservando sempre as caraterísticas fenotípicas e sensoriais de maior interesse do mercado, como: doçura, cor, tamanho. Logo, a propagação *in vitro* dessa espécie mostra-se como uma alternativa promisora e viável diante desse cenário (XI, X. et al.,2019).

Nesse sentido, destaca-se que a micropropagação de cactos é uma técnica que já remonta há anos, porém ainda carece de mais estudos para consolidar protocolos e viabilizar economicamente essa produção (LEMA-RUMIŃSKA, 2014).

Sabe-se que o método de micropropagação é realizado sob condições assépticas *in vitro*, utilizando-se de fragmentos milimétricos da planta, aos quais são denominados de explantes, e assim a partir desses fragmentos pode-se produzir milhões de novas plantas, com uma qualidade bastante superior quando comparada a outras técnicas, pois essas são livres de vírus, crescem mais rápido, outro benefício é que o material obtido ao final do processo é idêntico ao original, sem nenhuma mutação ou variação genética da espécie, além de fornecer material de qualidade durante todo o ano, já que independem de estação (LEMA-RUMIŃSKA, 2014).

O grande problema para a disseminação dessa tecnologia é o custo da operação e a necessidade de especialistas para a realização desse método (DOGARA, 2022). Alguns dos fatores que encarecem essa técnica são as condições que o material vegetal utilizado para a propagação *in vitro* precisam ficar submetidos como condições controladas de luz, fotoperíodo e temperatura, também necessitam estar interagindo com substâncias orgânicas, como hormônios, que são produtos com alto valor agregado, além dos custos com autoclavagem que é uma técnica que eleva o custo de produção, demanda um maior tempo mas que é importante para a esterilização das vidrarias e do meio de cultura a ser utilizado (DEBERGH, 1991). Assim é notório que precisa-se urgente de maneiras viáveis para baratear essa técnica para que a mesma torne-se mais popularizada (DOGARA, 2022).

A autoclavagem é um procedimento que utiliza altas temperaturas e pressão por períodos 20 ou 40 minutos em média, para eliminação de

microrganismos no meio de cultura e em quase todas as vidrarias utilizadas para essa produção. Dessa forma, elevando os custos, sobretudo, pelo seu consumo energético e alto valor do equipamento (RODRIGUES, D.T. et al., 2013).

Assim, alternativas a esse método de esterilização são constantemente estudadas e testadas, á exemplo tem-se técnicas como o uso de micro-ondas, uso de peróxido de hidrogênio, deionizador, e também o uso de químicos como o hipoclorito de sódio (TRIVELLINI et al., 2020).

Todas essas alternativas precisam ser testadas para a espécie em estudo, pois aspectos como fitotoxicidade, período de exposição ao químico, concentração, entre outros precisam ser avaliadas em cada caso (TRIVELLINI et al., 2020).

Além disso, Teixeira et al. (2005) levantaram informações relevantes que permitiram desdobramentos para a esterilização química com NaClO para a propagação *in vitro* de espécies vegetais. Contudo, o estabelecimento de um protocolo de preparo de meios de cultura que utiliza, como esterilizante, o hipoclorito de sódio para sanitização carece de estudos que comprovem a concentração eficiente sem que comprometa o desenvolvimento da planta.

O presente estudo terá como objetivo testar a eficiência do hipoclorito de sódio para a esterilização química na multiplicação *in vitro* de *Hylocereus costaricensis,* levando em consideração também o desenvolvimento saudável da planta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pitaya

As pitayas são conhecidas mundialmente como Dragon Fruits ou Frutas-do-Dragão, pertencem à família Cactaceae, a qual possui aproximadamente 100 gêneros e 1.500 espécies nativas das Américas, mais especificadamente das florestas tropicais do México, América Central e do Sul, além disso possuem hábitos epífitos, raízes adventícias, modificação do caule para retenção de água, cladódio triangular, antese noturna, flor hermafrodita, e produzem frutos bem aceitos por suas características sensoriais e nutracêuticas, chegando a produzir duas safras por ano, é também considerada a árvore carnosa-frutífera mais importante economicamente da família dos Cactos, sendo cultivada em todo o mundo. Ademais, é uma planta perene que apresenta facilidade de adaptação, mas requer nutrientes específicos para sua formação (XI, X. et al.,2019).

Os frutos dessa espécie são de grande interesse econômico por apresentarem constituintes benéficos a saúde humana, sabor adocicado e aparência exuberante. Assim, diante dessas propriedades farmacológicas esse vegetal é caracterizado como antioxidante, antimicrobiano, fonte abundante de vitamina C, antidiabético e anticético. Esses aspectos nutricionais, tem comprovação em diferentes estudos que afirmam essas vantagens à saúde humana desencadeadas por esse fruto. Logo, já é comprovado que a pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) possui a capacidade de colaborar com a prevenção de câncer, além de outros benefícios como redução do risco de mortalidade cardiovascular. Essas características são resultado da constituição desses frutos que se mostram como fontes abundantes de compostos fenólicos e betalaínas (MOREIRA et al**.**, 2017).

Ademais, esses frutos também são caracterizados como fontes de vitamina C, licopeno, vitaminas do complexo B, cálcio, carotenoides, zinco, fósforo, potássio e magnésio. Também, a presença de oligossacarídeos encontrados tanto na polpa de pitaya branca, quanto na vermelha apresentam propriedades prebióticas. Não obstante, as sementes de pitaya contêm um óleo com função laxativa suave, e que contribuem para redução dos níveis de do colesterol Lipoproteína de Baixa Densidade. Destaca-se também, que o óleo das sementes

é rico em ácido linoléico, e assim mostra-se promissor para utilização como uma nova fonte de óleo essencial. Assim, diante dessas características as frutas desses cactos foram consideradas de baixo valor energético, rica em água e fibras, contribuindo dessa maneira, para uma alimentação saudável. Nesse sentido, diante dos estudos que estão sendo feitos sobre cada espécie de Pitaya, espera-se que seja desvendado ainda mais vantagens sobre esse vegetal (WINSON et al., 2020).

A pitaya possui a característica de fechar os estômatos durante o dia o que garante uma menor perda de água por transpiração, também os cladódios fazem esse armazenamento, isso faz com que esse vegetal seja extremamente eficiente na utilização da água. Nesse sentido, estudos apontam que chuvas constantes ou estiagens constantes, podem trazer queda a produtividade. Á exemplo tem-se um estudo que demonstrou para a pitaya *H. undatus*, uma estiagem de dez dias ocasionou elevado fechamento estomático, reduzindo em 57% a adsorção líquida de dióxido de carbono, dessa forma ocasionando uma redução na produtividade (Faleiro et al., 2021).

Com isso, revela-se que caso a oferta de água seja banida durante o período de florescimento ou frutificação, pode ocorrer uma má formação dos frutos ou abortamento das flores. Os estudos demostram que a pitaya até resiste a períodos de grade estiagens, mas o solo deve estar com culturas de cobertura ou adubação verde, além de que essa condição de estresse deixa a planta suscetível a doenças, como a antracnose. Também, não há boa resistência a pouca oferta de água em solos arenosos ou na época de enchimento de fruto. A demanda hídrica desse vegetal leva em consideração fatores como evapotranspiração local, textura do solo, sistema de irrigação utilizado, dentre outros (XI, X. et al.,2019).

Ademais, sendo essa planta de origem regiões quentes e úmidas, se faz necessário uma umidade para que essa possa atender níveis satisfatórios de produção, essa demanda é dada pelo parâmetro conhecido como coeficiente da cultura (Kc), que ainda está em estudo, mas as pesquisas estão empenhadas em sanar (WINSON et al., 2020).

A pitaya é considerada uma planta semiepífita, pois durante o desenvolvimento inicial utiliza outra planta para apoio/sustentação e

posteriormente emite suas raízes, que ao atingir o solo, enraízam e contribuem com a nutrição da planta. Dessa forma, a prática de propagação mais utilizada para essa é o tutoramento (LIMA, 2014).

Figura 1. Pomar de pitaya sob o método de tutoramento Fonte: Pixabay

No tocante ao florescimento desse vegetal, acontece normalmente decorrido um ano e meio ou dois, após o seu plantio. Sendo que essas flores tem características de abrirem durante a noite, e essa abertura tem uma duração de nove a quatorze horas. Esse fato está intimamente associado as condições climáticas da região que o pomar está inserido, principalmente temperatura, pois quanto mais quente, mais cedo se encerra a abertura floral pela manhã (LONE, 2020).

Figura 2. Flor de Hylocereus Undatus Fonte: Pixabay

Em relação ao ponto de colheita é sinalizado pela mudança de cor da casca desse fruto, que de verde passa para amarelo ou de verde para vermelho/rosa e escama metade verde e metade vermelha/rosa, a depender da espécie. Também, é importante destacar que o fruto de pitaya não é climatérico, ou seja, não amadurece após a retirada do mesmo da sua planta de origem, logo quando colhido verde a casca pode até mudar de coloração, porém não irá amadurecimentr, já que não haverá mudança elevação da doçura, nem redução da acidez (LIMA, 2014).

Ressalta-se que há diferenças genéticas entre as diferentes espécies, como também dentro de cada espécie. Dessa forma, essa variabilidade genética é largamente estudada em bases de melhoramento genético de plantas á fim de desenvolver cultivares geneticamente superiores. É sabido que para fins de produção de frutos há uma necessidade de uniformização das características dos vegetais, conservando sempre aqueles de melhor padrão considerando os aspectos relacionados a produção, tamanho, formato e características físico-químicas (JUNQUEIRA, 2010).

Há quatro espécies com um potencial comercial superior, são essas: a Hylocereus undatus, apresentam frutos grandes com casca vermelha e polpa branca, Hylocereus costaricensis, possuem frutos médios com casca vermelha e polpa vermelha, *Hylocereus megalanthus* é relatando com frutos médios com casca amarela e polpa branca e a *Hylocereus setaceus* (RORIZ et al., 2022).

***Figura 3**. Diferenças de cores de polpa entre a H. Costariensis (á direita) e H. Undatus (á esquerda) Fonte: Pixabay*

As espécies *H. undatus* e *H. megalanthus* são as mais cultivadas no mundo. Sendo que a *H. undatus* tem destaque comercial devido à sua alta produtividade e produção de frutos grandes e a espécie *H. megalanthus* por produzir frutos amarelos com uma polpa muito doce (LONE, 2020).

Em todo o mundo destaca-se um aumento exponencial do monocultivo de diferentes espécies de pitaya, assim é certo que junto a isso também ocorra uma seleção de pragas que atacam esses pomares. Essas pragas variam de acordo com a região, condições de clima e variam também em função dos pomares vizinhos e as doenças que atacam esses últimos. Á exemplo de pragas que atacam os cultivares de pitaya tem -se a Abelha Irapuá que causa danos nos cladódios, botões florais e frutos. Esse ataque aos cladódios prejudica a formação de brotos ou botões florais (MELO et al., 2019).

Ademais, esses voadores se alimentam raspando as brácteas das flores e frutos, causam sujeira ao eliminar excrementos, além dessas raspas causarem lesões que ficam negras com o passar dos dias, causando impactos negativos na aparência dos frutos (JUNQUEIRA, 2010).

Também outras doenças são relatadas nesses frutos como a antracnose, causada pelos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum truncatum*, os quais atacam principalmente os cladódios jovens. Também, a Podridão por fusarium, ocasionada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, que provoca lesões necróticas e de aparência seca, a Podridão mole ou pectobacteriose, desencadeada bactéria *Pectobacterium carotovora* ou *Erwinia carotovora*, que prejudica os caules, brotos vegetativos jovens e raramente frutos, a Podridão por *Rhizopus*, é ocasionada pelo fungo *Rhizopus sp.*, que em geral lesiona órgãos de reserva, apresentando como principal sintoma o apodrecimento do fruto (ROHIN et al., 2012).

Diante disso, é conhecido que os fatores bióticos, isoladamente, não são os únicos precursores de doenças nesses pomares, estresse por fatores ambientais, também são relatados causando danos em cladódios, que podem evoluir para a podridão, também os raios solares ocasionam podridão em cladódios, causando morte nos tecidos (WU et al., 2019).

Em relação a comercialização desse fruto existe uma padronização, onde os maiores possuem uma maior aceitação no mercado. Logo, os de menores

tamanhos são direcionados a vias de processamento para que não venham a virar resíduos e assim se perca toda a riqueza fitoquímica desses alimentos. Nessa perspectiva, por processos de industrialização converte-os em polpas geleias, sorvete, licor, cerveja, suco, entre outros (LUO et al., 2014).

No Brasil a pitaya destaca-se por ser uma fruta exótica, por isso possui alto valor. O Sudeste é o estado que concentra a maior produção do país, correspondendo a mais de 50% de toda a produção nacional, isso justifica-se pela alta adaptabilidade dessa planta as condições edafoclimáticas dessa região. Outras regiões como São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais se também destacam nessas produções anuais. Ademais, as ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação relacionadas ao melhoramento genético das pitayas são muito recentes no Brasil e no mundo (ROHIN et al., 2012).

2.2 *Hylocereus costaricensis*

A pitaya vermelha (*Hylocereus costaricensis*) é oriunda das florestas tropicais da América Central e do Sul, Índia e Malásia, encontra-se num vasto grupo de frutas exóticas com bom potencial de comercialização. A espécie *Hylocereus* começou a ser cultivada no Brasil, na década de 90, no estado de São Paulo, de modo que a região Sudeste é a principal produtora, com destaque à cidade de Catanduva (SP), que apresenta o maior rendimento nacional (WU et al., 2019).

A busca por frutas exóticas tem aumentado gradativamente devido a suas características, apresentando sabor diferenciado, bom conteúdo de minerais, fibras e compostos antioxidantes. A pitaya vermelha é uma fruta rica em compostos bioativos, dentre eles compostos fenólicos, que contribuem com a capacidade antioxidante do fruto. Efeitos benéficos desempenhado por estes compostos estão relacionados com à prevenção de doenças degenerativas como câncer, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (ROHIN et al., 2012).

A pitaya vermelha apresenta o grupo de compostos fenólicos das betalaínas, as quais dividem-se em betaxantinas (coloração amarela) e betacianinas (coloração violeta). Um terço do peso da pitaya vermelha é representado por sua casca que apresenta um formato escamoso e cor vermelho

purpura. Resíduos de frutas e vegetais são tradicionalmente considerados um problema ambiental, porém esses coprodutos têm sido cada vez mais utilizados para saúde humana por seu potencial nutricional, antioxidante e para a extração de compostos, como pigmentos (LUO et al., 2014).

A transformação da casca de pitaya vermelha em um ingrediente de fácil manuseio, como a farinha, é benéfico. Seu potencial de aplicação é muito amplo, pois a mesma pode ser adicionada a vários tipos de alimentos como bebidas, produtos lácteos, sorvetes, iogurtes, bebidas à base de frutas, pães, barras saudáveis e molhos. Devido à sua cor característica, também pode ser usada como corante natural nos alimentos (MELO et al., 2019).

Figura 4. Suco de pitaya Fonte: Pixabay

2.3 Meios de propagação da pitaya

A pitaya é uma planta que pode ser propagada por sementes, por vias vegetativas estaquia e enxertia, ou também por micropropagação (JUNQUEIRA, 2010).

Nesse sentido, sabe-se que as plantas originadas de sementes irão demorar mais para produzir, devido a superação do período juvenil, que leva uma média de quatro a oito horas, além de apresentarem uma vasta variabilidade genética, esse último é de grande valia para os programas de melhoramento genético vegetal, porém não para pomares que visem a comercialização desses

frutos, já que essa variabilidade resulta em desuniformidades entre as plantas (LEMA-RUMINSKA, 2014).

O método de estaquia consiste na multiplicação de uma planta através de suas partes vegetativas como folhas, ramos, galhos ou estacas. Se tratando de pitayas esse processo acontece através dos cladódios, esses são obtidos, seccionados em no mínimo 20 centímetros e posteriormente tratados para que possa torna-se uma muda saudável e retornar ao campo, esse método é vantajoso no tangente ao menor tempo para obtenção das mudas e conservação das características genéticas das plantas matrizes. Contudo, mostra algumas desvantagens, á exemplo possui um grande risco de proliferação de pragas e doenças (RODRIGUES et al., 2013).

A propagação por enxertia, é realizada com uma associação íntima entre partes de diferentes plantas que continuam seu crescimento como um ser único. Para a pitaya esse método é mais utilizado para a *H. undatus*, pela sua capacidade de resistência a fitopatógenos. Esse processo realiza-se por maneiras conhecidas como garrafagem, que é o enxerto com várias gemas ou borbulhia, com apenas uma gema.

Também, a micropropagação desponta como uma tecnologia relativamente atual quando comparada a outras técnicas, mais especificadamente a micropropagação de cactos é ainda um assunto novo, que carece de protocolos que consolidem as maneiras mais viáveis de obter-se o material desejado. Essa técnica é realizada sob condições assépticas com a utilização de pequenas partes da planta, denominados explantes (LEMA-RUMINSKA, 2014). O processo de desenvolvimento *in vitro* desses explantes pode ocorrer por duas vias, a organogênese e embriogênese somática (CARVALHO et al., 2006).

O plantio dessas mudas de pitaya pode ocorrer da forma tradicional, com a abertura de pequenas covas e sulcos, ou pelo método de amontoa, onde coloca-se a muda no solo junto ao palanque, e entaõ a amontoa a terra junto à muda, não ultrapassando um terço da altura da muda e amarra a muda com barbante ao palanque (LEMA-RUMINSKA, 2014).

Outro ponto a destacar-se sobre o plantio é que pode ser plantada mais de uma muda por palanque, visando formação da copa com mais rapidez. No entanto, deve-se atentar para não plantar mais que duas mudas, para que

nenhuma seja desfavorecida na competição por nutrientes, iluminação, entre outros (MOREIRA et al., 2017).

2.4 Cultura de tecidos

Essa técnica consiste na prática de propagar uma cópia idêntica a matriz selecionada (explante) e assim garantir pomares homogênos, garatindo também uma produção em larga escala já que a partir de um único explante pode-se obter inúmeras cópias (CARVALHO et al., 2006).

É de grande importância para diversas áreas do conhecimento, dentre essas o melhoramento genético (TROMPE, 2007). Ressalta-se que não existe um protocolo que atenda todos as plantas em culturas de tecidos, cada genótipo se comporta de maneira singular e deve ser levantados estudos em cada caso (ESTRADA et al., 2008).

Para obter sucesso na produção de mudas micropropagadas é necessário dominar todas as etapas do processo, que subdividem-se em cinco fases, onde a fase 0 consiste é a etapa preparativa ou seja é essencial no desenvolvimento de um esquema de micropropagação confiável e repetível, subsequentemente na fase 1 objetiva-se estabelecer culturas estéreis e viáveis, posteriormente a fase 2 visa à proliferação, na fase 3 visa a produção de estacas ou plântulas e na etapa 4 visa o restabelecimento em casa de vegetação (KOZAI et al, 1992).

Nessa perspectiva, o meio de cultura é essencial, já que é esse que simula as condições ótimas de solo para o desenvolvimento da muda, dessa maneira cada planta necessita de nutrientes específicos, nesse sentido o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais utilizado para cultivo in vitro, inclusive em cactáceas.

A demanda por transplantes de alta qualidade tem feito da micropropaçao um mecanismo mais solicitado, porém destaca-se que os custos para essa técnica são elevados, já que necessita-se de reagentes caros,, mao de obra qualificada, equipamentos especializados, entre outros fatores. Portanto, mecanismos que reduzam os custos dessa produção estão sendo constantemente testados e validados para que essa técnica possa ser popularizada o mais rápido possível, salienta-se que esses mecanismos de

redução de custos nao significam necessariamente troca de mão de obra humana por máquinas ou equipamentos (SAHU, 2013).

A micropropagação mostra vantagens em relação a outras técnicas de produção de mudas por independer de fatores climáticos, não necessitar de grande espaços para a acomodação de explantes, baixo risco de contaminações, não sofrem interferências de fatores externos como índice pluviométrico ou incidência de raios solares, atende produção em escala industrial, a produção pode ser continuada durante todo o ano, ademais esse material pode ser armazenado por longos períodos de tempo (GEORGE, et. al., 2007).

2.5 Formas de esterilização em cultura de tecidos

O processo de esterilização consiste em eliminar inteiramente todos microrganismos encontrados nesse cultivo, pois esses competem por nutrientes, liberam toxinas e, consequentemente, podem ocasionar a morte do tecido micropropagado (SMITH, 2000). Nesse sentido, sabe-se que a esterilização pode ser realizada por procedimentos físicos, como microondas, e químicos, com uso do hipoclorito de sódio (NaClO) ou peróxido de hidrogênio (H2O2) (TEIXEIRA et al., 2005).

O cultivo de plantas *in vitro* é em suma uma técnica de alto valor agregado, nesse aspecto tem-se que o processo de esterilização comumente utilizado, a esterilização por calor úmido (autoclavagem) onera bastante esses custos, já que envolve um equipamento que tem um valor econômico elevado, consome bastante energia, necessita de um profissional habilitado para a manuseio, além de que alguns estudos já apontam que essa máquina também diminui o rendimento do meio nutritivo. Esse procedimento faz uso da autoclave, onde utiliza-se temperaturas em torno de 121º C e pressão de 1 kgf cm-2, por períodos de 20 minutos para meios de culltura e quarenta minutos para vidrarias, visando a eliminação de qualquer microrganismos contaminante (RODRIGUES, D.T. et al., 2013).

Com isso, algumas técnicas de esterilização já estão sendo pesquisadas para substituir a autoclavagem, dentre essas destaca-se a esterilização química que utiliza reagentes de fácil acesso e baixo custo. O ácido peracético, por

exemplo, é um quimico de ação viricida, bactericida e fungicida e é utilizado como desinfetante em diversas industrias, também o dióxido de cloro é considerado um potente desinfetante e agente oxidante, ademais o peróxido de hidrogênio pode reduzir a contaminação de meios de cultura, já o hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio são comumente usados como agentes esterilizantes para explantes cultivados in vitro (RODRIGUES et al., 2013). Essa técnica utiliza substância em baixa concentração para que não interfira no crescimento dos explantes, não prejudique o crescimento das plantas micropropagadas, e garanta a eficiência no controle de microrganismos. (CARDOSO, 2012).

Além das esterilização química e por calor úmido, também foram feitos testes com o uso do microondas mas não proporcionou o resultado esperado (TEIXEIRA *et al*., 2005a).

2.6 Esterilização química com hipoclorito de sódio (NaClO)

A esterilização química com hipoclorito de sódio foi reportada por Araújo e Teixeira (1998; 1999) e Teixeira et al. (2005a; 2005b), para cultura de tecidos de plantas, e puderam levantar informações importrantes que servem de base para estudos em diversas culturas.

Recentemente, Teixeira et al. (2006) mostraram que o uso do referido protocolo, além de permitir a eliminação da contaminação introduzida no meio pelos explantes provenientes de cultura in vitro de abacaxizeiro, resultou também no aumento do número de ramos e do peso da biomassa fresca.

Desde então vários trabalhos vem sendo reportados na literatura fazendo uso desse químico, em busca sempre da concentração ideal desse composto para que esterilize efetivamente o meio e vidrarias sem comprometer a viabilidade do explante.

Griffings & Ray (1979), comparando hipoclorito de sódio com hipoclorito de cálcio, afirmam que este último apresenta a vantagem de ser menos tóxico para os tecidos vegetais. A ação germicida das soluções de hipoclorito se deve a alta capacidade oxidante desses compostos, atuando na destruição da atividade das proteínas celulares (TSAI et al., 1998). Apesar de a oxidação ser um processo que pouco interfere no desenvolvimento do material vegetal e não contribui para o

aparecimento de contaminações, esta dificulta a visualização caso esteja presente, aumentando a probabilidade de propagação da contaminação durante os sucessivos subcultivos (KÖPP et al., 2009)

Teixeira et al. (2006) avaliaram a esterilização do meio de cultura acrescido com hipoclorito de sódio e o comportamento in vitro do abacaxizeiro Smooth Cayenne cv. e não constataram contaminações a partir de 0,0003% de hipoclorito de sódio. Os autores concluíram que o esterilizante proporcionou um efeito benéfico no crescimento e na multiplicação do abacaxizeiro. Ribeiro (2006), ao avaliar a influência da concentração de cloro ativo (c. a.) total no meio de cultura de Ananas comosus L. e de Sequoia sempervirens L., constatou que concentrações superiores a 0,0003% de c. a. total em meios de cultura semi-sólidos, submetidos a tratamento de fusão do agente gelificante, asseguram total esterilização do meio nutritivo. Dados positivos quanto à utilização de esterilização química também foram registrados por Matsumoto et al. (2007), por meio da adição de 0,02g.L-1 de hipoclorito de sódio, na forma de água sanitária comercial, ao meio MS líquido ou semisólido, para cultivar brotos de bananeira in vitro, não contabilizando qualquer contaminação microbiana nestes meios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado da Bahia – UNEB (coordenadas geográficas 9° 24' S de latitude, 40° 30' W de longitude e 368 m de altitude).

Com início em Março de 2022 e finalização em Junho de 2022. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é BSwh clima "quente, semiárido, com verão chuvoso", evapotranspiração elevada, a temperatura média é de 26,3ºC.

3.2. Material vegetativo

O material utilizado já estava estabelecido *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos do DTCS/Campus III/UNEB.

As sementes utilizadas para esse estabelecimento, foram coletadas em Irecê/BA. A desinfestação das sementes ocorreu em álcool 70% por 30 segundos e, em seguida, foram colocadas em hipoclorito de sódio 1%. Posteriormente, foram inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de White, suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose e 7g de ágar e pH ajustado para 5.7 ± 5.8, mantidos na sala de crescimento com iluminação de led, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25º C.

3.3 Meios de cultura e introdução dos explantes

Esses testes foram conduzidos com o objetivo de observar o efeito das concentrações de cloro ativo total adicionado ao meio de cultura, sobre a eliminação de microrganismos e em relação a reação dos tecidos de *Hylocereus costaricensis* cultivados no meio nutritivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e a esterilização química realizada conforme o protocolo de Teixeira et al. (2006).

A água utilizada para a diluição dos reagentes foi esterilizada em dias anteriores, pela adição de duas gotas de água sanitária por litro de água deionizada.

Os tratamentos foram: A) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional com esterilização térmica (MURASHIGE e SKOOG, 1962), (tratamento controle I); B) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional (MURASHIGE e SKOOG, 1962), sem nenhuma autoclavagem (tratamento controle II); C) meio de cultura MS, preparado utilizando apenas água autoclavada para completar o volume final do meio mas sem autoclavagem de vidrarias e meio nutritivo após o preparo (tratamento controle III); D) meio de cultura MS, esterilizado químicamente, com a vidraria enxaguada com água clorada e adicionado de 0,001% de cloro ativo total ao meio nutritivo (tratamento IV); E) meio de cultura MS, esterilizado químicamente, com a vidraria enxaguada com água clorada e adicionado de 0,003% de cloro ativo total ao meio nutritivo (tratamento V).

No tratamento I, utilizou-se a autoclavagem por um período de quarenta minutos para esterilização de vidraria e água, vinte minutos para esterilização do meio de cultura a uma temperatura de aproximadamente 121ºC a 1 kgf/cm^2 .

No tratamento III, foi utilizado apenas água autoclavada para diluição do meio de cultura para seu volume final. Enquanto, no tratamento II não foi utilizado nenhum meio para esterilização.

Os tratamentos esterilizados quimicamente obedeceram aos seguintes passos: a vidraria utilizada no preparo do meio de cultura, foi enxaguada com água deionizada adicionada de duas gotas de água sanitária, pouco antes do início do preparo do meio. No momento do preparo do meio de cultura, os reagentes, a glicose e o ágar, foram colocados em um Erlenmeyer, seguindo-se a adição de NaClO a 0,001%, (para o tratamento IV) e 0,003% de NaClO (para o tratamento V) como fator esterilizante do meio.

Após 15 minutos da adição do NaClO com os reagentes, foi completado o volume final do meio com água deionizada adicionada de 0,0005% de NaClO (p/v), corrigir o pH para 6,0 ± 0,1 e o Erlenmeyer foi levado ao forno de microondas para fundir o ágar.

Após o preparo, o meio nutriente foi distribuído em alíquotas de 20 ml por frasco de cultura (250 ml), que foram então deixadas abertas dentro da cabine de fluxo laminar por 10 minutos para a volatilização do cloro. Os explantes foram introduzidos nos frascos que não apresentaram crescimento visível de microrganismos após 48 h.

No momento do enchimento com o meio de cultura, os tubos de ensaio foram enxaguados com água clorada a 0,001% de cloro ativo total, com exceção dos tratamentos-controle.

As operações de preparo do meio de cultura foram efetuadas sobre a bancada do laboratório, em ambiente não-estéril e somente o enchimento dos frascos com o meio de cultura foi efetuado no ambiente estéril da capela de fluxo laminar.

As culturas foram incubadas por 60 dias em sala de crescimento com temperatura de 26 + 1°C, com fotoperíodo de 16 h e irradiância de 19 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes OSRAM® , do tipo “luz do dia” e 40 Watts de potência.

A coleta de dados correspondentes à contaminação do meio de cultura foi feita pelo aspecto visual destes a olho nu, foram consideradas como não contaminadas as culturas que se apresentaram límpidas, sem nenhuma mancha na superfície ou no interior do meio de cultura.

3.5 Caracteristicas avaliadas

Foram avaliados periodicamente entre 20, 40 e 60 dias as características relacionadas a sobrevivência, contaminação, hiperidricidade, clorose, necrose apical, oxidação e número médio de raízes.

E ao final do experimento, a quantidade de calos, brotos totais, brotos menores que 1 cm, brotos entre 1 e 2 cm, brotos maiores que 2 cm, raízes adventícias e comprimento da parte aérea foram avaliadas em cada tratamento.

3.6 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, cinco repetições e quatro parcelas experimentais; cada parcela foi representada por um frasco com um explante.

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados que não atingiram a normalidade (número total de brotos, brotos entre 1 e 2 centímetros, brotos maiores que 2 centímetros e número de raízes principais) foram transformados com $\sqrt{X} + 1$.

Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância pela ANOVA e

quando significativas, as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Houve efeito significativo para esterilização química com hipoclorito de sódio para os parâmetros de comprimento da parte aérea e comprimento da raiz. Não houve diferenças significativas para as variáveis raiz adventícia e brotos menores que 1 cm (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio aos 60 dias de cultivo. Universidade do Estado da Bahia, 2022.

Concentração de cloro ativo (m/v)	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz	Raiz adventícia	Brotos menores que 1 cm
Autoclavado	1.88 a	1.67 b	1.84 a	2.23 a
0,001%	1.64 b	1.47 b	1.54 a	1.85 a
0,003%	1.90 a	2.12 a	1.77 a	2.24 a
F	0.0146*	0.0034*	0.1450 (ns)	0.3330 (ns)
CV (%)	10.93	21.25	19.79	29.26

*Os valores médios seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente no teste de Tukey com 5% de significância.

Os tratamentos I e V (autoclavado e na concentração de 0,003%, respectivamente) apresentaram as melhores médias para a variável comprimento da parte aérea. Corroborando com o que Cardoso et al, constatou em 2009 quando avaliou diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para esterilização química no cultivo in vitro de cana-de-açúcar e percebeu que a maior concentração desse químico, resultou em explantes com maior comprimento da parte aérea em relação aos demais tratamentos e também ao controle, esse fato pode sugerir influência positiva no crescimento das mudas conforme aumenta a concentração de cloro ativo no meio de cultura, provavelmente, por permitir às plântulas uma melhor absorção dos nutrientes do meio (CARDOSO, 2009).

Para o comprimento da raiz, o tratamento V, apresentou a maior média dentre os tratamentos avaliados. Os tratamentos I e IV, não se diferiram estatísticamente para essa variável (Tabela 1). É possível que esses resultados para essa variável, estejam relacionados ao aumento na concentração de hipoclorito de sódio. De acordo com Emmanuel et al (2004) a presença de cloro estimula o desenvolvimento dos tecidos vegetais, além de ser essencial às

plantas quando mantido em quantidades compatíveis com a exigência da espécie.

Não foram observadas entre os tratamentos, diferenças significativas para as variáveis raiz adventícia e para brotos menores que 1 cm, evidenciado pelo valor de F superior a 0.05 (Tabela 1). Demonstrando que as concentrações utilizadas de NaClO avaliadas, não exerceram influência para essas variáveis, sendo iguais ao tratamento autoclavado (tabela 1).

Todos os tratamentos apresentaram formação de calos (Figura 5). A formação de calos em cactos cultivados *in vitro*, é reportada rotineiramente na literatura e está relacionada a concentração de BAP utilizada no meio nutritivo (Diaz et., 2003).

Esses fatores, evidenciam a necessidade de mais estudos relacionados a elaboração de protocolos para a *Hylocereus costaricensis*.

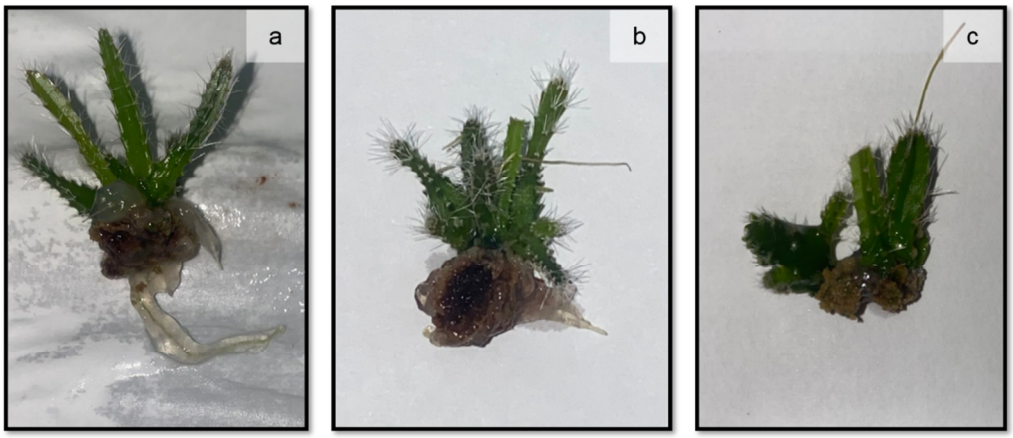

Figura 5. Todos os tratamentos apresentaram formação de calos. (a) tratamento controle; (b) tratamento com 0,001% de NaClO;(c) tratamento com 0,003%.

No experimento realizado houve 100% de sobrevivência em todos os tratamentos que foram introduzidos explantes.

No tratamento sem esterilização, houve 100% de contaminação após 24 h, impedindo a inoculação dos explantes (Figura 6). Comprovando a necessidade da utilização de metodologia para esterilização dos meios de cultivo e vidrarias.

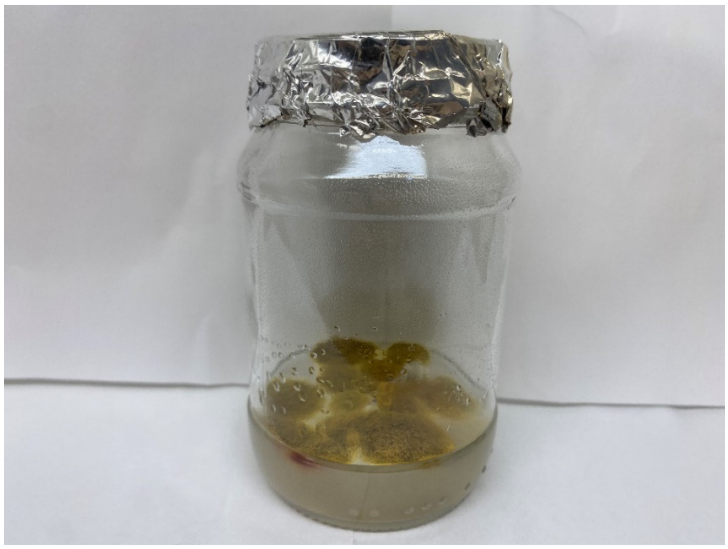

Figura 6. Controle II após 24 horas.

O tratamento III (com água autoclavada para a diluição do meio de cultivo) apresentou uma contaminação tardia e com colônias bem discretas, devido ao uso da água esterilizada para diluição do meio (Figura 6).

Em princípio, são determinadas quatro fontes de contaminação: a fonte de explante, meio nutritivo, o ambiente e a habilidade do operador (SOUZA et al.,2008). Uma das causas de contaminação por fungos está relacionada a cuidados no ambiente. Mesmo com cuidados com assepsia, em biofábricas brasileiras já foram registradas porcentagens de contaminação superiores a 30% causadas tanto por fungos como por bactérias (OLIVEIRA et al.; 2000).

Souza (2008), verificou em seu experimento de propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa* (orquídeas), que com algumas medidas de limpeza na prática e na manipulação houve considerável redução na contaminação.

A contaminação se estabelece no meio de cultura ou no explante competindo pelos nutrientes, além de produzir substâncias tóxicas e inibir o desenvolvimento do material introduzido, podendo resultar na sua perda. Desta forma é fundamental que as instalações apresentem características apropriadas, os equipamentos e a execução da pratica propiciem um ambiente com elevado nível de assepsia.

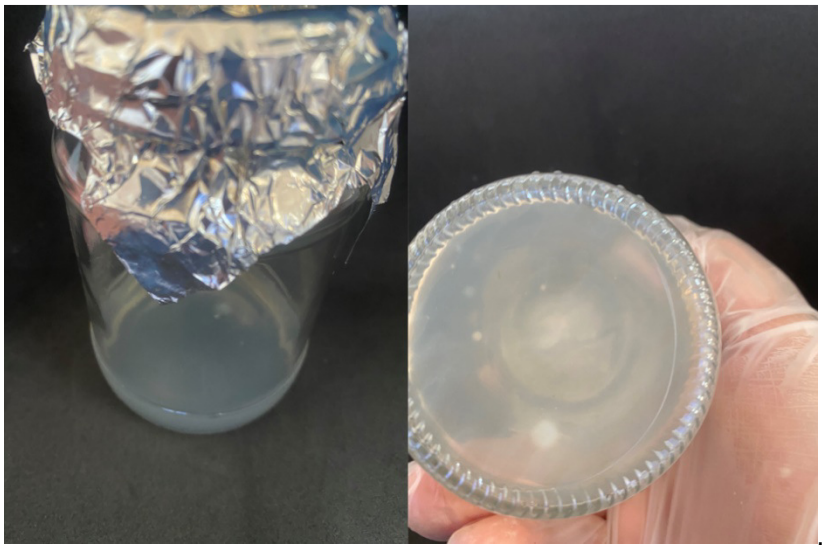

Figura 7. Contaminação do tratamento III.

O tratamento IV que continha 0,001% de NaClO apresentou apenas um frasco com contaminação, o que corresponde a 5 % de contaminação dentro desse tratamento, dessa forma estando dentro dos limites aceitáveis quanto a taxa de contaminação esperada para esterilização em cultura de tecidos que é de até 10%, em laboratórios comerciais (Figura 7).

Figura 8. Contaminação do tratamento I ao 11º dia de cultivo. Fonte: autoria própria

Todos os tratamentos apresentaram hiperidricidade, esse fato pode estar associado ao protocolo da *H.costaricensis* ainda não estar bem estabelecido

necessitando de ajustes na concentração de reguladores utilizados. A hiperidricidade é considerada uma desordem fisiológica, bioquímica e morfológica decorrente do acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos, as plantas cultivadas *in vitro* estão, indubitavelmente, sob contínua condição de estresse, os quais resultam em alterações metabólicas características do estresse oxidativo. Essa desordem pode ser desencadeada por fatores físicos, relacionados ao ambiente dos recipientes de cultivo e consistência do meio de cultura ou por fatores químicos como os componentes do meio de cultura, em especial dos reguladores de crescimento em altas concentrações (VASCONCELOS, 2012).

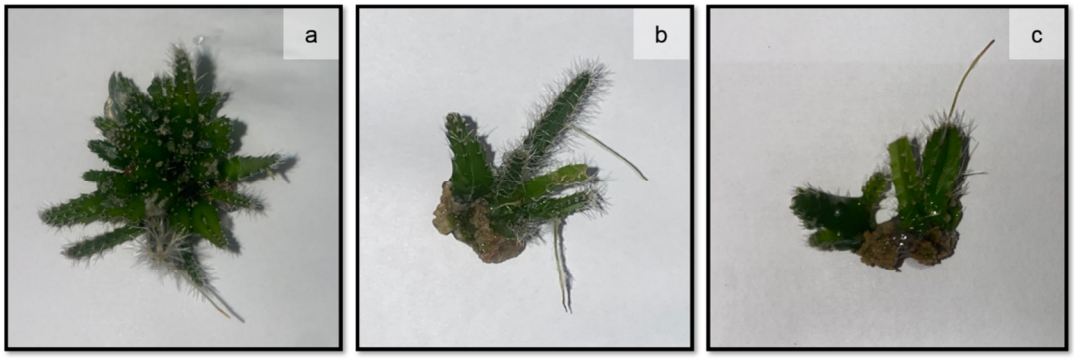

Figura 9. Todos os tratamentos apresentaram hiperidricidade. (a) tratamento controle; (b) tratamento com 0,001% de NaClO; (c) tratamento com 0,003% de NaClO. Fonte: autoria própria.

O tratamento V, não foi inferior ao tratamento autoclavado em nenhuma das variáveis analisadas estatisticamente. Esses resultados corroboram com o obtido por Teixeira et al. (2006) sobre a viabilidade do uso do hipoclorito de sódio, em baixas concentrações, como esterilizante em cultura de tecidos vegetais, desde que se adotem as demais medidas de assepsia.

Embora o tratamento V, não tenha sido inferior com relação as variáveis dispostas na tabela 1, com relação as brotações com comprimento de 1 a 2 cm e acima de 2 cm, foram observados um maior número de explantes não responsivos. Justifica-se isso pelo fato de que o número a medida que o número de brotações aumenta o comprimento deles diminui, e vice-versa, já que a biomassa total produzida estará em função da quantidade de nutrientes disponível no ambiente limitado do frasco de cultura (RIBEIRO, 2011).

Em relação a necrose apical, oxidação e clorose, não foi verificado em

nenhum explante submetido a utilização de hipoclorito de sódio, também não foram verificadas essas características nos explantes esterilizados termicamente, em nenhuma das avaliações realizadas durante o período de 20, 40 e 60 dias.

5. CONCLUSÕES

A esterilização química com hipoclorito de sódio pode substituir a esterilização térmica na multiplicação de *H.costaricensis in vitro*, mesmo em baixas concentrações como a de 0,001% de NaClO, desde que haja o cuidado com as manipulações durante todo o processo, bem como a assepsia do ambiente.

No presente estudo, os meios de nutrição esterilizados quimicamente usando 0,003% (tratamento II) de cloro ativo total resultaram em plantas completamente livre de contaminações e sem sintomas de fitotoxicidade.

REFERÊNCIAS

ANA, K. P. et al. Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of Gerbera hybrida cv. Essandre. **African journal of biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1995–1998, 2016.

CARDOSO, J. C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo in vitro de antúrio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, n. 7, p. 785–788, 2009.

CUNHA, L. C. M. et al. Effect of microencapsulated extract of pitaya (Hylocereus costaricensis) peel on oxidative quality parameters of refrigerated ground pork patties subjected to UV-C radiation. **Journal of food processing and preservation**, v. 45, n. 3, 2021.

DE JESUS FERREIRA GODINHO. **Bioativos Das Pitayas de Polpas Branca E Vermelha**. [s.l.] Novas Edicoes Academicas, 2015.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: **Micropropagation**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. p. 1–13.

DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation || Micropropagation**. [s.l.] Chapter, 1990.

DOGARA, M. Effect of plant growth regulators, basal media strength and carbon sources on Hylocereus costaricensis (red dragon fruit) seed germination. **Eurasian journal of science and engineering**, v. 7, n. 2, p. 149–162, 2022.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Pitayas**: atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação na Embrapa Cerrados. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2021. 62 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 62).

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. D. Micropropagation: Uses and Methods. In: **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer Ntherlands, 2007. p. 29–64.

HAO, M. et al. Identification of allergens in white- and red-fleshed pitaya (Selenicereus undatus and Selenicereus costaricensis) seeds using bottom-up proteomics coupled with immunoinformatics. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1962, 2022.

HOSHINO, A. T. et al. First Record of Cactoblastis cactorum Berg, 1885 (Lepidoptera: Pyralidae) in Hylocereus lemairei (Hook.) Britton & Rose and H. costaricensis (F.A.C. Weber) Britton & Rose (Cactaceae) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e238020, 2021.

JOSHI, M.; PRABHAKAR, B. Phytoconstituents and pharmaco-therapeutic benefits of pitaya: A wonder fruit. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 7, p. e13260, 2020.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FONSECA, K. G.; LIMA, C. A. ; SANTOS, E. C. Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 840-846. 2010b.

KOZAI, T. et al. The in vitro environment and its control in micropropagation. In: **Transplant Production Systems**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992. p. 247–282.

LE BELLEC, F.; VAILLANT, F.; IMBERT, E. Pitahaya (Hylocereusspp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v. 61, n. 4, p. 237–250, 2006.

LEMA-RUMIŃSKA, J.; KULUS, D. Micropropagation of cacti—a review. **Haseltonia**, v. 19, p. 46–63, 2014.

LIMA, C. A.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G. Avaliação de características físico-químicas de frutos de duas espécies de pitaya**. Revista Ceres**, v. 61, n. 3, 2014. p. 377-383.

LONE, A. B.; BELTRAME, A. B.; SILVA, D. A.; GUIMARÃES, G. G. F.; HARO, M. M.; MARTINS, R. S. **Cultivo de Pitaia**. Florianópolis, 2020. 44p. (Epagri. Boletim Técnico, 196).

MOREIRA, A. R. et al. Determinação do comprimento da estaca para a produção de mudas de pitaia (Hylocereus costaricensis) em ambiente protegido. **Tecno-Lógica**, v. 21, n. 2, p. 41, 2017.

OLIVEIRA, L. M. et al. Salt stress and organic fertilization on the growth and biochemical metabolism of Hylocereus costaricensis (red pitaya)

seedlings. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e258476, 2022.

RODRIGUES, D. T. et al. Chemical sterilization in in vitro propagation of Arundina bambusifolia Lindl. and Epidendrum ibaguense Kunth. **Revista CERES**, v. 60, n. 4, p. 447–451, 2013.

RORIZ, C. L. et al. Red pitaya (Hylocereus costaricensis) peel as a source of valuable molecules: Extraction optimization to recover natural colouring agents. **Food chemistry**, v. 372, n. 131344, p. 131344, 2022.

SAHU, J.; SAHU, R. K. A review on low cost methods for in vitro micropropagation of plant through tissue culture technique. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**, v. 1, n. 1, p. 38–41, 2013.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Chemical sterilization of culture medium. 3. Flasks filling and medium inoculation under non-sterile environment. **Horticultura Brasileira**, BrasÌlia, DF, v. 23, n. 2. p. 592, 2005c.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (Ananas comosus cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro de *Eucalyptus pellita* L. **Ciencia Florestal**, v. 18, n. 2, p. 185–191, 2008.

TEIXEIRA, S. L.; TEIXEIRA, M. T.; RIBEIRO, J. M. Chemical sterilization of culture medium. 1. Culture flasks and covers - rinsing with chlorinated water. **Horticultura Brasileira**, BrasÌlia, v. 23, n. 2. p.591, 2005a.

TEIXEIRA, S. L.; TEIXEIRA, M. T.; RIBEIRO, J. M. Chemical sterilization of culture medium. 2. Addition of sodium hypochlorite to the medium. **Horticultura Brasileira**, BrasÌlia, DF, v. 23, n. 2. p. 591, 2005b.

TRIVELLINI, A. et al. Pitaya, an attractive alternative crop for Mediterranean region. **Agronomy (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 8, p. 1065, 2020.

VASCONCELOS, A. G. V. DE et al. Hiperidricidade: uma desordem

metabólica. **Ciencia rural**, v. 42, n. 5, p. 837–844, 2012.

WINSON, K. W. S. et al. Effect of amino acid supplementation, elicitation and LEDs on Hylocereus costaricensis callus culture for the enhancement of betalain pigments. **Scientia horticulturae**, v. 289, n. 110459, p. 110459, 2021.

WINSON, K. W. S. et al. The establishment of callus and cell suspension cultures of Hylocereus costaricensis for the production of betalain pigments with antioxidant potential. **Industrial crops and products**, v. 155, n. 112750, p. 112750, 2020.

WINSON, K. W. S. et al. The establishment of callus and cell suspension cultures of Hylocereus costaricensis for the production of betalain pigments with antioxidant potential. **Industrial crops and products**, v. 155, n. 112750, p. 112750, 2020.

XI, X. et al. Transcriptome analysis clarified genes involved in betalain biosynthesis in the fruit of red pitayas (Hylocereus costaricensis). **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 3, p. 445, 2019.