

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Lecythis pisonis* CAMBESS

**Simone Wellita Simão de Carvalho¹, Tamyris de Mello², Eduardo Santos Cade¹,
Mariana Ribeiro de Almeida¹, João Pedro Vieira Fraga de Assis², José Carlos
Lopes¹, Rodrigo Sobreira Alexandre²**

¹Universidade Federal do Espírito Santo - Departamento de Agronomia, Alto Universitário, s/n,
Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, simonewellita@gmail.com, eduardo.cade@edu.ufes.br,
mariribeiro11@hotmail.com, jclufes@gmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Avenida
Governador Lindemberg, 316, 29550-000, Jerônimo Monteiro - ES, Brasil,
tamyrisdemello@gmail.com, joaopedrov80@gmail.com, rodrigossobreiraalexandre@gmail.com

Resumo

Lecythis pisonis Cambess, é uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência nos biomas da Floresta Atlântica e Amazônia. Um dos grandes entraves desta espécie é a propagação natural por suas sementes, a qual apresenta dormência, baixa e desuniforme emergência de plântulas e curta viabilidade. A cultura de tecidos vegetais, é uma técnica que pode contribuir para uma multiplicação rápida na produção de novas plantas. Sendo assim, objetivou-se com essa pesquisa desenvolver um protocolo de desinfestação para segmentos nodais de *L. pisonis*. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (CCAUE-UFES), no município de Jerônimo Monteiro – ES. O material vegetativo utilizado foi coletado em plantas enxertadas cultivadas em casa de vegetação, os quais foram levados para desinfestação e estabelecimento em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Foram avaliados seis tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + Carvão ativado (CA) / 8 horas e o Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + Carvão ativado (CA) / 24 horas, apresentaram eficiência no controle da contaminação por fungos.

Palavras-chave: cultura de tecidos vegetais. sapucaia. cloridrato de ciprofloxacino.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônoma – Engenharia Florestal

Introdução

A sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess), é uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência nos biomas da Amazônia e Floresta Atlântica (SMITH, 2023). Esta espécie apresenta grande potencial para o mercado, devido a produção de castanhas com alto valor nutricional (CARVALHO, 2013; BRASIL, 2022). Além disso, é recomendada para práticas de reflorestamento, apresenta madeira de boa qualidade, e é apropriada para diversos outros usos, incluindo a construção civil (LORENZI, 1998).

Um dos grandes entraves desta espécie é a propagação natural por sementes, a qual apresenta dormência, emergência desuniforme e curta viabilidade (LORENZI, 1998; MONTEIRO, 2015). Nas plantas de sapucaia, o processo de produção dos frutos acontece quando as árvores atingem a idade de 8 a 10 anos (BRASIL, 2022), o que dificulta a dissiminação da espécie.

O avanço das tecnologias, permitiu o desenvolvimento de pesquisas para facilitar a reprodução de espécies vegetais que apresentam dificuldades em reproduzir naturalmente por sementes, fosse suprida por meio de técnicas que otimizam a propagação assexuada da espécie, de forma eficiente, atendendo as demandas do mercado (RICKLI *et al.*, 2015).

A cultura de tecidos vegetais é uma dessas técnicas, que pode contribuir para uma multiplicação rápida na produção de mudas, o que minimiza a problemática da germinação que algumas espécies apresentam, geralmente devido a presença de dormência e recalcitrância (PELEGRINI *et al.*, 2013).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Por este motivo, o cultivo *in vitro* tem se tornado uma alternativa importante para a propagação de espécies vegetais, diante do exposto, objetivou-se com essa pesquisa desenvolver um protocolo de desinfestação para segmentos nodais de *L. pisonis*.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), no município de Jerônimo Monteiro - ES.

O material vegetativo utilizado foi coletado em plantas de sapucaia enxertadas cultivadas em casa de vegetação, as quais foram submetidas a aplicação semanalmente de fungicida, intercalando entre o Across® (2 mL L⁻¹) e o Serenade® (20 mL L⁻¹).

Nessas plantas foram coletadas as brotações novas, sendo essas levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, e com o auxílio de uma tesoura, foram separados os segmentos nodais (explantos) contendo uma gema axilar, todos foram lavados em água corrente e detergente neutro. Após o preparo dos explantes, estes foram separados em seis quantidades iguais, e armazenados em Erlenmeyer (250 mL). Na câmara de fluxo laminar, o processo de desinfestação consistiu na imersão dos explantes por um minuto em álcool 70%, lavagem com água destilada e autoclavada, hipoclorito de sódio 2,5% (Qboa®) por 20 minutos, tríplex lavagem em água destilada e autoclavada, e posteriormente foi aplicado uma solução de cloridrato de ciprofloxacino (3 g L⁻¹), em diferentes intervalos de tempo, com ausência ou presença de polivinilpirrolidona (PVP) ou carvão ativado (Tabela 1), onde permaneceram sob agitação em agitador orbital (Shaker) sob temperatura controlada a 27 °C, no escuro.

Tabela 1- Tratamentos avaliados na desinfestação de segmentos nodais de *Lecythis pisonis*

Tratamentos		Descrição dos tratamentos
1	CC8h	Cloridrato de ciprofloxacino (CC) / 8 horas
2	CC8h+PVP	Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + PVP / 8 horas
3	CC8h+CA	Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + Carvão ativado (CA) / 8 horas
4	CC24h	Cloridrato de ciprofloxacino (CC) / 24 horas
5	CC24h+PVP	Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + PVP / 24 horas
6	CC24h+CA	Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + Carvão ativado (CA) / 24 horas

Fonte: o autor.

Após o tempo estabelecido para cada tratamento, todos foram lavados por três vezes com água destilada e autoclavada, e submetidos ao fungicida Across (4 mL L⁻¹) onde permaneceram por 30 minutos no shaker. Foram adicionadas 3 gotas/100 mL de polissorbato 20, no hipoclorito de sódio, no cloridrato de ciprofloxacino, e no Across quando diluídos.

Em seguida, os explantes foram estabelecidos em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura MS com vitaminas de Gamborg (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L⁻¹ de mioinositol (Sigma-Aldrich®), 1 g L⁻¹ de PVP (Synth®), 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®), e pH ajustado a 5,7 ± 0,1, e autoclavados. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 60 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 8/16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C. Após uma semana, foi contabilizado semanalmente o número de explantes contaminados para se calcular a porcentagem de contaminação, para determinação do tratamento mais eficiente. As avaliações do experimento ocorreram durante cinco semanas. Sendo contabilizado a cada sete dias, a contaminação por fungos e bactérias, oxidação e morte dos explantes após o estabelecimento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos, e quatro

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

repetições de dez tubos de ensaio com um explante cada. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2023).

Resultados

Os tratamentos utilizados apresentaram diferenças significativas, quanto a porcentagem de contaminação por meio de fungos e bactérias, e na porcentagem de oxidação e morte dos segmentos nodais de *L. pisonis*, os quais podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de contaminação por fungos e bactérias, e porcentagem de oxidação e morte de segmentos nodais de *Lecythis pisonis*

Tratamentos	Fungos (%)	Bactérias (%)	Oxidação (%)	Morte (%)
CC8h	4,99 c ¹	36,66 bc	9,99 c	51,65 b
CC8h+PVP	4,99 c	23,33 d	21,66 ab	49,99 b
CC8h+CA	0,00 c	31,66 cd	23,33 a	54,99 b
CC24h	15,38 b	23,07 d	15,38 abc	53,83 b
CC24h+PVP	31,24 a	41,66 b	12,49 bc	85,40 a
CC24h+CA	0,00 c	73,33 a	9,99 c	83,32 a

¹Médias não seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: os autores. Abreviação: CC8h. Cloridrato de ciprofloxacino por 8 horas; CC24h. Cloridrato de ciprofloxacino por 24 horas; PVP. Polivinilpirrolidona; CA. Carvão ativado.

A maioria dos tratamentos utilizados apresentaram contaminação por fungos ou bactérias, oxidaram ou morreram os explantes. Entretanto os tratamentos que não obtiveram contaminação por fungos foram o CC8h+CA e o CC24h+CA, não diferenciando estatisticamente dos tratamentos CC8h e CC8h+PVP, ambos com média 4,99%. Já para a contaminação por bactérias, os tratamentos CC8h+PVP, CC8h+CA, CC24h apresentaram as médias menores e foram considerados iguais estatisticamente (Tabela 2).

Os tratamentos CC8h, CC24h, CC24h+PVP, CC24h+CA foram os que apresentaram menores médias em relação a porcentagem de oxidação, e foram considerados iguais estatisticamente. Quanto a porcentagem de morte dos explantes, os tratamentos CC8h, CC8h+PVP, CC8h+CA e CC24h foram considerados iguais estatisticamente (Tabela 2).

Discussão

Na cultura de tecido vegetais, o processo de desinfestação é um fator crucial para a estabelecimento de espécies cujo material vegetal é proveniente de plantas *ex vitro*, visto que, o ambiente de cultivo *in vitro*, por mais estéreis que sejam, apresentam condições favoráveis para o crescimento de bactérias e fungos (SILVA *et al.*, 2015).

Um bom indício desta pesquisa, foi a eficiência encontrada no controle da contaminação por fungos com o uso dos tratamentos CC8h+CA e o CC24h+CA, ambos contendo o carvão ativado, o qual desempenha diversas funções, em se tratando da cultura de tecidos vegetais, como por exemplo, a redução de intoxicações, atuação como antioxidante e estimulação do enraizamento nos tecidos (CALDAS *et al.*, 1998).

Alguns tratamentos apresentarem-se com médias baixas nas porcentagens de contaminações, mostrando, que o uso do cloridrato de ciprofloxacino na desinfestação de segmentos nodais da espécie, pode ser eficaz. Porém, no período em que foi analisado, ele não impediu a contaminação do material por completo e por este motivo deve-se testar novos protocolos para se obter sucesso nas pesquisas de cultura *in vitro*. Visto que a contaminação dos tecidos vegetais por microrganismos é um problema antigo nas práticas de cultura de tecidos (ANDRADE, 2002).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

Os tratamentos, Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + Carvão ativado (CA) / 8 horas e o Cloridrato de ciprofloxacino (CC) + Carvão ativado (CA) / 24 horas, utilizados no processo de desinfestação dos segmentos nodais de *Lecythis pisonis*, foram eficientes para assepsia do material vegetativo contra a contaminação por fungos.

Referências

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro**: região norte / editores: Lidio Coradin, Julcéia Camillo e Ima Célia Guimarães Vieira – Brasília, DF: MMA, 2022.1452 p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **A cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CNPH. 1998.

CARVALHO, I. M. M. de. **Composição e efeito da castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.) nos parâmetros bioquímicos, histológicos e inflamatórios em ratos alimentados com dieta de cafeteria**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 106p. 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa, SP. Plantarum, 1998.

MONTEIRO, T. L. **Divergência Genética em sapucaia baseada em características juvenis**. Monografia de conclusão de curso. 2015. Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro. 27 p. 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PELEGRINI, L. L. *et al.* In vitro germination of zygotic embryonic axes of imbuia (*Ocotea porosa* (NEES EX MARTIUS) liberato barroso. **Revista Árvore**, v. 37, p. 231-236, 2013.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 jul. 2023.

RICKLI, H. C. *et al.* Origem de brotações epicórmicas e aplicação de ácido indolilbutírico no enraizamento de estacas de *Vochysia bifalcata* Warm. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 2, p. 385-393, 2015.

SILVA, L. C. *et al.* Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 674-679, 2015.

SMITH, N. P. ***Lecythis* in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB8561>. Acesso em: 31 jul. 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e inovação do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq - Chamada CNPq Nº 09/2022 - Bolsas de Produtividade em Pesquisa (Sementes zigóticas e sintéticas de castanheiras-do-Brasil na conservação sexuada e assexuada deste patrimônio genético inexplorado);

À FAPES - EDITAL FAPES Nº 21/2022 APOIO À INFRAESTRUTURA DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO EM LABORATÓRIOS INTERDISCIPLINARES (Laboratório Interdisciplinar de Ciências do Espírito Santo (LICES)) e EDITAL FAPES Nº 03/2021 – UNIVERSAL (Conservação/criopreservação *ex situ* de embriões zigóticos e somáticos das castanheiras *Lecythis pisonis* e *Lecythis lanceolata* endêmicas do hotspot de biodiversidade ameaçada - Floresta Atlântica).