

DESINFESTAÇÃO *IN VITRO* DE *CARINIANA LEGALIS*

Esdras Mendes da Cunha, Katia Aguiar de Souza Monteiro, Mayla Bessa Scotá, Elias Terra Werner, Milene Miranda Praça Fontes.

Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil,
esdrasmio@gmail.com, kati Monteiro0603@gmail.com, mayla_scotta@hotmail.com,
elias.werner@ufes.br, milenemiranda@yahoo.com.br.

Resumo

O jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze) é uma planta lenhosa pertencente a família Lecythidaceae que ocorre ao longo da Mata Atlântica. A exploração desorganizada reduziu a quantidade de indivíduos desta espécie. Esta situação inclui a espécie na lista vermelha de espécies ameaçada de extinção, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza. Neste cenário, torna-se necessário investir em estratégias para conservação, propagação e reflorescência de espécies arbóreas representativas da Mata Atlântica, como o jequitibá-rosa. O primeiro passo deste estabelecimento é a germinação *in vitro* das sementes de *C. legalis*. As sementes foram testadas em três diferentes tempos de desinfestação por imersão em solução de hipoclorito de sódio. Além, da desinfestação, testou-se a quebra de dormência das sementes por imersão em água quente logo após a desinfestação. O uso de hipoclorito de sódio demonstrou ser uma abordagem eficaz na promoção da germinação. Por outro lado, o tratamento térmico com água quente revelou-se extremamente prejudicial a germinação das sementes.

Palavras-chave: Sementes. Jequitibá-rosa. Desinfestação. Protocolo.

Área do Conhecimento: Fisiologia.

Introdução

O jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze) é uma planta lenhosa pertencente a família Lecythidaceae que ocorre ao longo da Mata Atlântica (Catenacci et al. 2020). Esta espécie ocorre nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro (Smith et al. 2015). Está dispersa de forma irregular e descontínua, ocorrendo em alta densidade em algumas áreas, e pouca densidade ou ausência completa em outras (Lorenzi, 2008).

Encontrada na floresta ombrófila densa, ocupa regiões de clima quente, úmido com temperatura média de 25°C. Suas árvores chegam a atingir os 60 metros de altura e diâmetro de tronco de 4 metros na idade adulta (Carvalho, 2005). A madeira de *C. legalis* possui alto valor econômico, sendo muito utilizados nas indústrias de construção civil, celulose e moveleira, entre outras em menor exploração (Rêgo, 2002; Carvalho, 2005).

A exploração desorganizada reduziu a quantidade de indivíduos desta espécie. Esta situação a inclui na lista vermelha de espécies ameaçada de extinção, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), sendo classificados como vulneráveis, numa escala de 7 grupos que variam entra em uma categoria um pouco preocupante e categoria extinta (IUCN, 2023).

Neste cenário, torna-se necessário investir em estratégias para conservação, propagação e reflorescência de espécies arbóreas representativas da Mata Atlântica, como o jequitibá-rosa considerada árvore símbolo do estado do Espírito Santo (Lei nº 6.146, de 8 de fevereiro de 2000). Pensando neste problema do jequitibá-rosa sobre a ameaça de extinção e dada a sua importância ecológica, histórica, cultural e comercial, uma das soluções para reverter esta situação está na produção, distribuição e plantação de mudas. A produção de mudas pode ser feita utilizando técnicas de propagação vegetativa, como a micropropagação que é definida como uma propagação clonal de plantas a partir de pequenas partes de plantas (0,2-10,0mm) sob condições *in vitro* (Wendling et al. 2006).

Através disso, a presente proposta tem como objetivo geral desenvolver um protocolo de micropropagação de jequitibá-rosa, no sentido de avaliar as condições mais favoráveis à germinação,

estabelecimento in vitro e micropropagação. A fim de que futuramente possa possibilitar a regeneração de mudas e a produção para distribuição a produtores rurais da região Sul do Estado do Espírito Santo pela conservação e uso sustentável da Mata Atlântica.

O primeiro passo é a germinação in vitro das sementes de *C. legalis*. Para tal, é necessário estabelecer o protocolo eficaz de desinfestação e germinação in vitro destas sementes, tendo em consideração a baixa disponibilidade de dados confiáveis na literatura e a perda da viabilidade das sementes ao longo do tempo após a dispersão (Aragão et al. 2019).

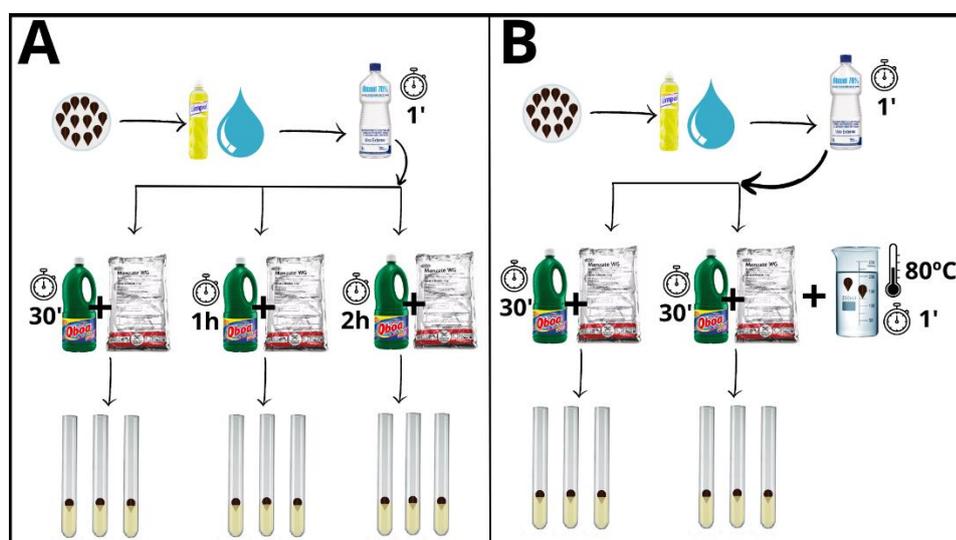
Os tratamentos de desinfestação e germinação que foram primeiramente descritos por Aragão et al, 2016 serão adaptados e testados afim de certificar as melhores opções de desinfestação e germinação das sementes comerciais de *C. legalis*.

Metodologia

As sementes de jequitibá-rosa foram obtidas comercialmente junto a empresa Plante Pássaros (Itatiba, SP) sendo adquiridas aproximadamente 350 sementes. As sementes primeiramente foram lavadas com água corrente e detergente e logo submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% (v/v) por 1 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) (NaClO), a partir deste ponto separou-se os tratamentos.

O primeiro grupo de sementes (T1) foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) + Fungicida Manzate® (1 g L⁻¹) por 30 minutos em agitação mecânica intermitente. O segundo grupo (T2) por 1 hora em agitação. O terceiro grupo (T3) por 2 horas (Figura 1.A.). Ainda houve mais dois grupos que foram testadas em relação ao choque térmico para quebra de dormência. Após a desinfestação por 30 minutos em hipoclorito de sódio, as sementes (T5), foram lavadas entre 5 a 6 vezes em água destilada e autoclavada seguido de imersão por 1 minuto em água à 80°C, para possível quebra de dormência, para este tratamento foi realizado grupo controle (T4), cujo foi submetido ao mesmo tratamento exceto o banho a 80°C (Tabela 1).

Figura 1. Desinfestação de sementes de jequitibá-rosa adquiridas comercialmente. A. Teste de tempo de exposição ao agente desinfestante. B. Teste de quebra de dormência.



Fonte: O autor.

Em seguida, as sementes foram lavadas entre cinco a seis vezes em água destilada esterilizada. As mesmas foram inoculadas posteriormente em tubos (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura; 4,4g L⁻¹ de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com acréscimo de 7,5 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para entre 5.6 a 5.8 e depois, autoclavado a 121° C por 20 minutos. O experimento foi conduzido por 60 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo

de 16/8 h (luz/escuro) e temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20W, Osram®). As sementes inoculadas foram cobertas com sombrite 70%. As avaliações avaliadas foram porcentagem (%) de contaminação e % de sobrevivência.

Tabela 1- Tratamentos propostos: T1, T2 e T3 diferem no tempo de exposição ao hipoclorito de sódio. T4 e T5 testam a imersão em água quente como fator de quebra de dormência.

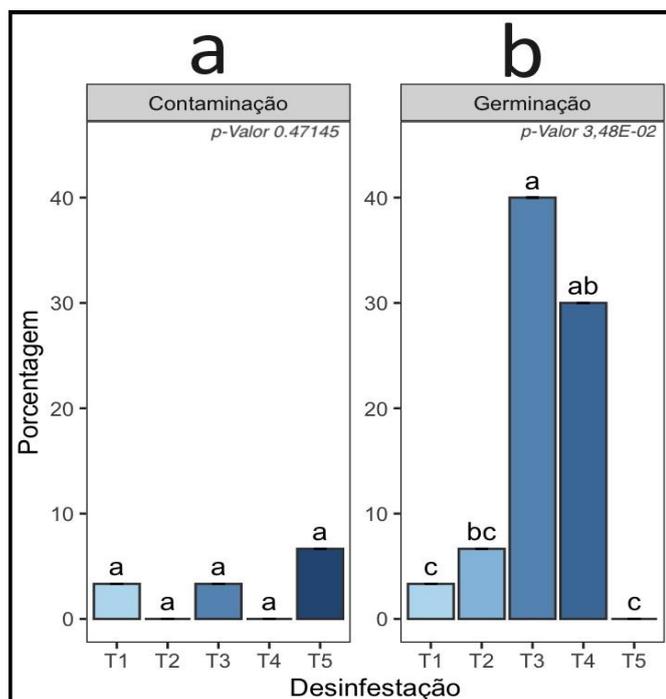
Tratamento	Descrição Resumida	Quantidade
T1	30 minutos	28
T2	1 hora	32
T3	2 horas	33
T4	30 minutos	52
T5	30 min + 1 min em H ₂ O à 80°C	157

Fonte: o autor.

Resultados

Os resultados estatísticos dos tratamentos de desinfestação apresentaram duas variáveis: germinação e contaminação sendo contabilizados 60 dias pós inoculação. A variável de germinação (60 dias) em sementes de jequitibá-rosa, apresentaram *p*-valor significativo ($<0,05$), indicando que os resultados são estatisticamente relevantes. No entanto, na variável de contaminação não foi significativo (Figura 2).

Figura 2. Porcentagem de contaminação (a) e germinação (b) em diferentes tratamentos de desinfestação de sementes de jequitibá rosa inoculadas em meio MS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Fonte: O autor.

Os resultados da variável que apontam os níveis de contaminação das sementes, não apresentou diferença estatística significativa entre si, com todos os cinco tratamentos se mantendo abaixo dos 10% de contaminação. Os resultados de germinação apontam estatisticamente que o T3 apresenta o melhor desempenho de germinação após 60 dias de inóculo, seguido de T4 e T2. Os tratamentos T1, T2 e T3 mostraram qual o melhor intervalo de exposição ao hipoclorito de sódio durante o protocolo de desinfestação. Portanto, o T3 que é o tratamento com 2 horas de exposição apresentou o melhor resultado dentre os três tratamentos (Figura 1.a.). Os tratamentos T4 e T5 buscaram testar um método de quebra de dormência por banho térmico em água a 80°C. O tratamento T4, que serviu como grupo controle, onde as sementes não foram imersas no banho térmico, apresentou melhor desempenho na germinação. Consequentemente o método para quebra de dormência não foi eficaz em sementes de jequitibá-rosa (Figura 1.b.).

Discussão

Com base nos resultados obtidos onde sementes de jequitibá-rosa submersas por 2 horas em hipoclorito de sódio apresentaram maior germinação em comparação com as que ficaram por apenas 30 minutos e 1 hora. Sendo possível explorar algumas explicações fundamentadas na literatura científica para tal. O tratamento com hipoclorito de sódio é comumente utilizado para desinfestação e quebra de dormência em sementes. Silva et al. (2020) relataram que o hipoclorito de sódio, ao reduzir a carga microbiana nas sementes, pode levar a uma melhoria significativa nas taxas de germinação de várias espécies vegetais. Estudos, como o de Luna et al. (2019), mostram que o hipoclorito de sódio pode ser eficaz na quebra de dormência e desinfecção de sementes de espécies florestais, aumentando as taxas de germinação quando utilizado em tempos e concentrações adequados. Em um estudo contínuo de Oliveira et al. (2018), foi demonstrado que tratamentos prolongados com hipoclorito de sódio podem ser mais eficazes na quebra de dormência de sementes com tegumento resistente, que é o que ocorre com a semente de jequitibá, desde que as concentrações e tempos sejam cuidadosamente controlados. A exposição das sementes de jequitibá-rosa ao hipoclorito de sódio por 2 horas foi mais eficaz na promoção da germinação devido à combinação de desinfestação por mais tempo e potencial quebra de dormência, sem induzir danos fitotóxicos significativos. Esses fatores explicam por que o tempo de exposição mais longo resultou em maior germinação, conforme corroborado pelos estudos acima citados.

O tratamento térmico a 80°C por 1 minuto parece ter sido prejudicial às sementes de jequitibá-rosa, resultando em uma total ausência de germinação. Esse resultado pode refletir a alta sensibilidade da espécie ao calor, indicando que métodos menos agressivos devem ser considerados para a quebra de dormência ou promoção da germinação. As sementes que não foram submetidas ao tratamento térmico tiveram maior sucesso germinativo, indicando que o jequitibá-rosa pode não necessitar de tratamentos térmicos extremos para iniciar seu processo de germinação. A exposição a altas temperaturas pode causar danos irreversíveis às células embrionárias das sementes, levando à perda da viabilidade (Teixeira et al. 2019). A temperatura de 80°C é bastante elevada e, embora o tempo de exposição tenha sido curto (1 minuto), essa temperatura pode ter sido suficiente para desnaturar proteínas, desestabilizar membranas celulares e inativar enzimas essenciais ao processo germinativo. Estudos, como o de Bewley et al. (2013), indicam que muitas sementes de espécies de florestas tropicais são sensíveis ao calor e podem ter suas viabilidades reduzidas quando expostas a temperaturas superiores a 70°C.

Conclusão

Portanto, concluímos que o desenvolvimento de um protocolo eficaz para a desinfestação e micro propagação de jequitibá-rosa deve focar em estratégias que maximizem a germinação das sementes e minimizem os danos a elas. O uso de hipoclorito de sódio demonstrado é uma abordagem eficaz na promoção da germinação, especialmente quando as sementes foram expostas ao agente desinfestante por um período mais prolongado, como 2 horas. Por outro lado, o tratamento térmico com água a 80°C por 1 minuto revelou-se extremamente prejudicial, resultando na completa inibição da germinação. Isso destaca a alta sensibilidade do jequitibá-rosa ao calor, afirmando que esse tipo de tratamento não é adequado para quebra de dormência ou desinfestação. Assim, é fundamental evitar a aplicação de temperaturas elevadas em qualquer estágio do protocolo de desinfestação ou preparação das

sementes, a fim de preservar sua viabilidade. Essas práticas visam maximizar a taxa de germinação e o sucesso da micro propagação do jequitibá-rosa, contribuindo para a conservação e propagação dessa importante espécie florestal.

Referências

ACCIOLY, F. **Publicações eletrônicas** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por mfmendes@uff.br em 24 abr. 2000.

Aragão, V.P.M., Ribeiro, Y.R.d.S., Reis, R.S., Macedo, A.F., Floh, E.I.S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2016). In vitro organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell Tiss Org Cult.** 124(3):611-620.

ARAGÃO, Victor Paulo Mesquita et al. Storage time affects the germination and proteomic profile of seeds of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze (Lecythydaceae), an endangered tree species native to the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, p. 407-419, 2019.

BEWLEY, J. Derek et al. Germination. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition**, p. 133-181, 2013.

CARVALHO, P.E.R. (2005). *Jequitibá-rosa*. Paraná: Embrapa Florestas. 10p

CATENACCI, F.S.; RIBEIRO, M.; SMITH, N.P.; CABELLO, N. B. *Cariniana in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB8543>>. Acesso em: 19 ago. 2024

ESPÍRITO SANTO. Lei nº 6.146, de 8 de fevereiro de 2000. Declara o Jequitibá-rosa, Árvore símbolo do Estado do Espírito Santo, institui o Dia Estadual do Jequitibá-rosa e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Espírito Santo, Vitória, ES, 9 fev. 2000.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/34747/9887065>>. Acesso em: 19 de ago. de 2024.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 2008. 384 p.

LUNA, PS; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, D. S. Efeito do hipoclorito de sódio na germinação de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 41, n. 2, pág. 157-164,

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.

OLIVEIRA, E. R.; SOUZA, L. M.; MENDES, P. G. Tratamento com hipoclorito de sódio e sua eficácia na superação da dormência de mudas florestais. *Silvicultura*, v. 48, n. 3, pág. 305–314,

REGO, Gizelda Maia. **Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*): espécie em extinção da floresta Atlântica**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. Rêgo, 2002;

SILVA, MA; GOMES, C. F.; ALMEIDA, T. R. Influência do tratamento com hipoclorito de sódio na desinfecção e germinação de sementes de espécies vegetais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, n. 5, pág. 220-228,

SMITH, N.P.; MORI, S.A.; PRANCE, G.T. 2015 *Lecythydaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8543>>.

TEIXEIRA, R. N.; OLIVEIRA, D. F.; GONÇALVES, B. P. Thermal sensitivity of tropical tree seeds and implications for seed handling and conservation. *Seed Science Research*, v. 29, n. 2, p. 135-142, 2019.

WENDLING, Ivar; DUTRA, Leonardo Ferreira; GROSSI, Fernando. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. 2006.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).