

PROTOCOLO DE DESINFESTAÇÃO *IN VITRO* COM ANTIBIÓTICOS PARA SEGMENTOS NODAIS DE *Lecythis pisonis*

Simone Wellita Simão de Carvalho¹, Ingridh Medeiros Simões², Débora Pellanda Fagundes², Joana Silva Costa¹, José Carlos Lopes², Rodrigo Sobreira Alexandre¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Agronomia, Alto Universitário, S/Nº, Guararema, 29500-000, Alegre - ES, Brasil, simonewellita@gmail.com, debora.pellanda@yahoo.com.br, jcufes@bol.com.br

²Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Avenida Governador Lindemberg, 316, Centro, 29550-000 – Jerônimo Monteiro - ES, Brasil, simoes.ingridh@gmail.com, joanasilvacosta9@hotmail.com, rodrigossobreiraalexandre@gmail.com

Resumo

A espécie *Lecythis pisonis* Cambess (Lecythidaceae), conhecida popularmente como sapucaia, é tradicionalmente propagada por sementes. No entanto, a emergência desuniforme e o tegumento rígido das sementes, composto por aproximadamente 60% de lignina, tornam a propagação semínifera desafiadora. Além disso, a colheita e o beneficiamento dos frutos são complexos. Diante dessas dificuldades, a cultura de tecidos surge como uma técnica promissora para a propagação em larga escala dessa espécie. Objetivou-se com esse trabalho desenvolver um protocolo de desinfestação para segmentos nodais de *L. pisonis*. O material vegetativo foi coletado de plantas enxertadas cultivadas em casa de vegetação e desinfestado antes de ser estabelecido em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Quatro tratamentos com diferentes tempos de exposição aos antibióticos amoxicilina e nitrofurantoína foram testados. Como resultado, recomenda-se o uso de amoxicilina na concentração de 6 g L⁻¹ por 4 horas, como protocolo eficaz para a desinfestação de segmentos nodais de *L. pisonis*.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais. Sapucaia. Antibiótico.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônoma/ Engenharia Florestal

Introdução

A espécie *Lecythis pisonis* Cambess. (Lecythidaceae), mais conhecida como sapucaia, ocorre normalmente nas Florestas Amazônica e Atlântica (LORENZI, 2002; SOUZA *et al.*, 2014). Geralmente é propagada via semínifera e apresenta emergência desuniforme (ARAUJO *et al.*, 2020). Possui castanhas ricas em compostos bioativos e atualmente está inserida no grupo de plantas alimentícias não convencionais (PANC) podendo ser utilizada como matéria-prima na produção de alimentos (KINUPP; LORENZI, 2021).

Suas sementes possuem tegumento rígido e espesso, com aproximadamente 60% de lignina. Características essas comuns em sementes com dormência física, que dificulta a entrada de água e consequentemente sua germinação (BASKIN; BASKIN, 2004; ROSA *et al.*, 2020). Além disso, plantas de sapucaia demoram entre 8 a 10 anos para começarem a produzir frutos (BRASIL, 2022). Diante dessa problemática e ainda pela dificuldade na colheita e beneficiamento de seus frutos, a cultura de tecidos surge como uma técnica que pode ser utilizada para propagá-la, visando a produção de mudas em larga escala (PELEGRIINI *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o cultivo *in vitro* tem se tornado uma alternativa importante para a propagação de espécies vegetais, a exemplo da sapucaia. Portanto, objetivou-se com esse trabalho 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.

Os explantes foram coletados em plantas de *L. pisonis* enxertadas e 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. Com a tesoura foram separados os segmentos nodais (explantes) contendo uma gema axilar e esses todos foram lavados em água corrente e detergente neutro.

Em 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, tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, e posteriormente foi aplicado uma solução de antibióticos amoxicilina® e nitrofurantoína®, em diferentes intervalos de tempo (Tabela 1), onde permaneceram sob agitação em agitador orbital (Shaker) sob temperatura controlada a 27 °C, no escuro.

Tabela 1 - Tratamentos na desinfestação de segmentos nodais de *L. pisonis*.

Tratamentos	Desinfestante	Tempo (horas)
1	Amoxicilina 6 g L ⁻¹	2
2	Nitrofurantoína 6 g L ⁻¹	2
3	Amoxicilina 6 g L ⁻¹	4
4	Nitrofurantoína 6 g L ⁻¹	4

Fonte: os autores.

Após o tempo estabelecido para cada tratamento, realizou-se tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, e submetidos ao fungicida Across® (2 mL L⁻¹) onde permaneceram por 30 minutos no shaker.

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 polivinilpirrolidona - 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. Utilizou-se para cada tratamento 4 repetições de 15 tubos cada e após 15 dias analisou-se a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana e oxidação.

Resultados

Os tratamentos aplicados para desinfestação de segmentos nodais de *L. pisonis* mostraram variações na porcentagem de contaminação bacteriana e oxidação (Tabela 2). Quanto à contaminação fúngica, os resultados indicaram que o uso do fungicida Across® (2 mL L⁻¹) por 30 minutos foi eficaz.

Tabela 2 – Contaminação (%) bactérias e fungos e oxidação (%) de segmentos nodais de *L. pisonis*.

Tratamentos	Contaminação (%)		Oxidação (%)
	Bactéria	Fungo	
1	5,5	0,5	13,5
2	36,0	0,0	12,5
3	2,5	0,0	31,5
4	25,5	1,0	21,5

Fonte: os autores.

Na contaminação por bactérias, o antibiótico nitrofurantoína, na concentração de 6 g L⁻¹ por 2 e 4 horas, apresentou as maiores porcentagens de contaminação entre os tratamentos testados. Por outro lado, ao utilizar a amoxicilina na mesma concentração de 6 g L⁻¹ por 4 horas, a contaminação foi significativamente menor, com apenas 2,5%.

A porcentagem de oxidação aumentou conforme o tempo de exposição se prolongou; nos tratamentos 3 e 4, onde os antibióticos foram mantidos por 4 horas, observaram-se as maiores médias de oxidação.

Discussão

A análise dos tratamentos aplicados para desinfestação de segmentos nodais de *L. pisonis* revela diferenças na eficiência de controle de contaminação bacteriana, fúngica e na ocorrência de oxidação. Os dados apresentados na Tabela 2 evidenciam que o tratamento 3, foi o mais eficaz na redução da contaminação bacteriana, resultando em apenas 2,5% de contaminação. Em contraste, o uso de nitrofurantoína® na mesma concentração e tempos de exposição de 2 e 4 horas (tratamentos 2 e 4) resultou em contaminações bacterianas substancialmente maiores, destacando-se como menos eficaz nesse contexto. A amoxicilina é um antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas, conhecido por seu amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ela atua inibindo a síntese de peptidoglicano, que é um componente essencial da parede celular bacteriana. Ao interferir nessa síntese, a amoxicilina enfraquece a parede celular, levando à lise e morte da bactéria (GOODMAN; GILDMAN, 2006; ARAÚJO, *et al.*, 2021).

Em relação à contaminação fúngica, o uso do fungicida Across® (2 mL L⁻¹) por 30 minutos mostrou-se eficiente, com níveis mínimos de contaminação registrados, especialmente no tratamento 2 e 3, onde não houve contaminação por fungos. Esse resultado sugere que o fungicida empregado é adequado para o controle de fungos nos segmentos nodais de *L. pisonis*.

A oxidação dos segmentos nodais mostrou uma tendência de aumento proporcional ao tempo de exposição aos antibióticos. Nos tratamentos 3 e 4, onde os antibióticos foram aplicados por 4 horas, observaram-se as maiores médias de oxidação, com valores de 31,5% e 21,5%, respectivamente. Isso indica que o prolongamento do tempo de exposição aos antibióticos pode intensificar a oxidação dos tecidos, o que pode comprometer a viabilidade dos segmentos nodais. A oxidação fenólica é um dos principais obstáculos no estabelecimento de explantes, especialmente em plantas lenhosas. Além disso, o tempo de exposição aos agentes desinfestantes pode contribuir para o aumento desse problema (TEIXEIRA, 2005).

Ao selecionar um tratamento para desinfestação de *L. pisonis*, deve-se considerar tanto a eficácia na redução da contaminação quanto o impacto sobre a oxidação dos tecidos. A amoxicilina se mostrou uma opção eficaz para o controle bacteriano com menor impacto na oxidação. Além disso, o fungicida Across® se destacou como uma solução eficiente para a prevenção de contaminação fúngica, sem contribuir significativamente para a oxidação.

Conclusão

A amoxicilina na concentração de 6 g L⁻¹ por 4 horas, destacou-se como o desinfestante mais eficaz para a redução da contaminação bacteriana, comparado a outros tratamentos para as variáveis analisadas. Portanto, recomenda-se para desinfestação de segmentos nodais de *L. pisonis* o uso de amoxicilina 6 g L⁻¹ por 4 horas, seguido de fungicida Across® (2 mL L⁻¹) por 30 minutos.

Referências

ARAÚJO, D. D. *et al.* A resistência bacteriana frente a antibióticos utilizada no tratamento da gonorreia: uma revisão de literatura. **Pesqui. Soc. Desenv.**, v. 10, n. 3, p. e16710313127-e16710313127, 2021.

ARAÚJO, C. P. *et al.* Overcoming seed dormancy and rooting in air-layering polyembryonic seedlings of sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess.). **Aust. J. Crop Sci.**, v. 14, p. 816-821, 2020.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Sci. Res.**, v. 14, p. 1-16, 2004.

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.

GOODMAN, L. S.; GILDMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2021. 768p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.1, 368 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 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.

ROSA, T. L. M *et al.* Sapucaia nut: Morphophysiology, minerals content, methodological validation in image analysis, phenotypic and molecular diversity in *Lecythis pisonis* Cambess. **Food Res. Int.**, v. 137, p. 109383, 2020.

SOUZA, A. S. *et al.* **Conhecendo espécies de plantas da Amazônia**: Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess. Lecythidaceae). p. 1-5, 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/999043/1/COM250.pdf>. Acesso em: 24 de ago. 2024.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa –Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, [s.d]. 2005

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG), através do projeto “Consolidação dos Programas de Pós-Graduação da área de Ciências Agrárias do Estado do Espírito Santo - Ciências Florestais” pelo apoio financeiro da pesquisa, por meio do Edital FAPES/CNPq Nº 23/2018 – PRONEM (Termo de Outorga 131/2021 e Processo Nº 2021-FDGS5); Edital FAPES nº 12/2021 - Programa de Capacitação de Recursos Humanos na Pós-Graduação - Doutorado (PROCAP 2022 – doutorado). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código financeiro 001, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, por disponibilizar a estrutura e equipamentos utilizados nesse trabalho.