

## **Germinação e controle da contaminação *in vitro* de sementes de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**

Rubio Neto, Aurélio<sup>1\*</sup>; Lima, Raphael Espósito de<sup>1</sup>; Vasconcelos, Jaqueline Martins<sup>2</sup> Ximenes, Francimar Alves<sup>1</sup>; Macagnan, Dirceu<sup>1</sup>; Santana, João das graças<sup>1</sup>; Silva, Fabiano Guimarães<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde-GO - Laboratório de Cultura de Tecidos; Rod. Sul Goiana; Km 01; Cx Postal 66; CEP: 75901-490; Rio Verde – GO; tel.:06436205617; Rio Verde – GO

<sup>2</sup>Graduando em Ciências Biológicas, FESURV.

\*Bolsista de IC do CNPq/CEFETRV. E-mail: aurelioneto@yahoo.com.br.

### **INTRODUÇÃO**

O cerrado, segunda maior formação vegetal brasileira, ocupando cerca de 22% do território nacional é considerada a savana com maior riqueza biológica, com mais de 10 mil espécies de plantas e segundo SANTOS (2004), muitas destas espécies apresentam futuro promissor conforme.

O pequi é considerado uma planta ornamental pela beleza de suas copas e flores, pertence a família *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar*. E segundo ALMEIDA *et al.* (1998) a espécie possui um porte arbóreo, produz cerca de 500 a 2000 frutos por planta. Quando oriundo de semente a frutificação do pequizeiro ocorre com cerca de 4 a 5 anos após o plantio. Através de enxertia pelo método de garfagem lateral, antecipa o início da frutificação, em um ou dois anos e ainda reduz o porta das plantas facilitando manejo e colheita (SILVA *et al.* 2001). O pequizeiro é considerado uma planta econômica, pois seus frutos são muito utilizados na culinária regional como fonte de vitaminas e extração de óleos para a fabricação de cosméticos, é considerada uma planta ornamental, melífera e medicinal. A amêndoa também produz óleo e pode ser consumida torrada. Alvo de sua própria qualidade, a madeira resistente produz um ótimo carvão vegetal, o qual é largamente explorado (SANTOS, 2004).

Para SANTOS (2004) a obtenção de explantes para a experimentação *in vitro* pode ser realizada por meio da germinação das sementes, ou por material oriundo de casa-de-vegetação ou campo, quando a espécie apresenta problema de contaminação severa.

O estabelecimento *in vitro* das espécies nativas apresenta grandes problemas com contaminação e oxidação (TEIXEIRA, 2004).

Segundo SATO *et al.* (2004), a contaminação depende da procedência do material vegetal utilizado para isolamento *in vitro*, que pode ser de casa de vegetação ou do campo. No caso de espécies florestais nativas, o material vegetal é retirado do campo, contendo elevada concentração de microrganismos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o estabelecimento *in vitro* de sementes de pequizeiro. Para isto as sementes foram submetidas a diferentes concentrações de agentes desinfestantes. Avaliou-se também o efeito de diferentes antibióticos no meio de cultura e no tratamento das sementes.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do CEFETRV, com sementes coletadas em outubro de 2006 na fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás – GO.

Para despolpa dos frutos, foi utilizado uma despolpadeira, objetivando a remoção do epicarpo e mesocarpo e parte do endocarpo. Em seguida as sementes contendo a parte final do endocarpo permaneceram em uma bandeja coberta com papel toalhas para secagem.

**Experimento 1.** Objetivando o estabelecimento *in vitro* de sementes de pequizeiro, foi realizado após a secagem das sementes um processo de desinfestação, onde foram lavadas em água corrente com 10 gotas de detergente comercial, por 10 min, e em seguida

ficaram submersas por 1 minuto em álcool 70%. Posteriormente, estas foram submetidas a diferentes processos de desinfestação conforme o tratamento: 1- 30 min em NaClO 10-12%; 2- NaClO 5-6%; 3- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado; 4- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50%. Na câmara de fluxo laminar, foram realizados 3 enxágües, utilizando água destilada e autoclavada. Em seguida as mesmas foram depositadas em frascos com capacidade para 268 mL, contendo 50 mL do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) 50% dos sais, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,00025 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de inositol, em ponte de papel germitest.

A incubação dos frascos ocorreu em temperatura de 25 °C ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 hs. As avaliações foram realizadas semanalmente até o terceiro mês após a inoculação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos 25 repetições cada, perfazendo 100 frascos com uma semente cada.

**Experimento 2.** Com o objetivo de controlar a contaminação bacteriana observada no experimento 1, foi avaliado o efeito de antibióticos no meio de cultura e no tratamento de sementes, conforme tabela 1.

Tabela 1. Combinação entre as diferentes formas de utilização de antibióticos visando o estabelecimento *in vitro* de sementes de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.).

Tratamento	Meio de Cultura	Tratamento de sementes
1	Sem antibiótico	Sem antibiótico
2	Sem antibiótico	Penicilina (32mg.L <sup>-1</sup> ), Gentamicina (32mg.L <sup>-1</sup> ), Tetraciclina (64 mg.L <sup>-1</sup> )
3	Penicilina (24mg.L <sup>-1</sup> ), Gentamicina (24 mg.L <sup>-1</sup> ), Tetraciclina (48 mg.L <sup>-1</sup> )	Sem antibiótico
4	Penicilina (24mg.L <sup>-1</sup> ), Gentamicina (24mg.L <sup>-1</sup> ), Tetraciclina (48 mg.L <sup>-1</sup> )	Penicilina (32mg.L <sup>-1</sup> ), Gentamicina (32mg.L <sup>-1</sup> ), Tetraciclina (64 mg.L <sup>-1</sup> )

Para desinfestação das sementes, foi realizada uma lavagem em água corrente utilizando 10 gotas de detergente comercial, durante dez minutos, sendo em seguida submersas por 1 min em álcool 70%, e durante 30 min em água sanitária comercial pura com teor de cloro ativo de 2,0 a 2,5. Em câmara de fluxo laminar foram realizados 3 enxágües utilizando água destilada e autoclavada. Posteriormente as sementes foram embebidas por 48 hs em solução de GA<sub>3</sub> na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Ao final de 48 hs, as sementes foram transferidas para frascos de vidro com capacidade para 268 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, constituído de água destilada e autoclavada, suplementada com Benomyl na concentração de 2,5 g.L<sup>-1</sup>; e ainda ausência e presença dos antibióticos, conforme os tratamentos.

Os frascos foram mantidos em temperatura de 25°C ± 2°C, e fotoperíodo de 16 hs.

O experimento foi implantado em esquema fatorial 2x2, sendo 2 tratamentos de sementes e 2 meios de cultura. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso (DBC), com 4 blocos com 15 repetições cada, perfazendo 240 frascos com uma semente cada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Experimento 1.** Ocorreu contaminação de 100% do experimento por bactérias, em prazo de 3 meses e não foi constatada nenhuma semente germinada (Figura 1).

CHAVES *et al.* (2005) também obtiveram em seu trabalho quantidade significativa de contaminação por bactérias em sementes mantidas em presença de luz, quando utilizado o hipoclorito de cálcio, e baixas taxas de germinação, as quais podem estar relacionadas ao

tempo de imersão ou até mesmo ao efeito dos agentes desinfestantes utilizados para o tratamento das sementes.

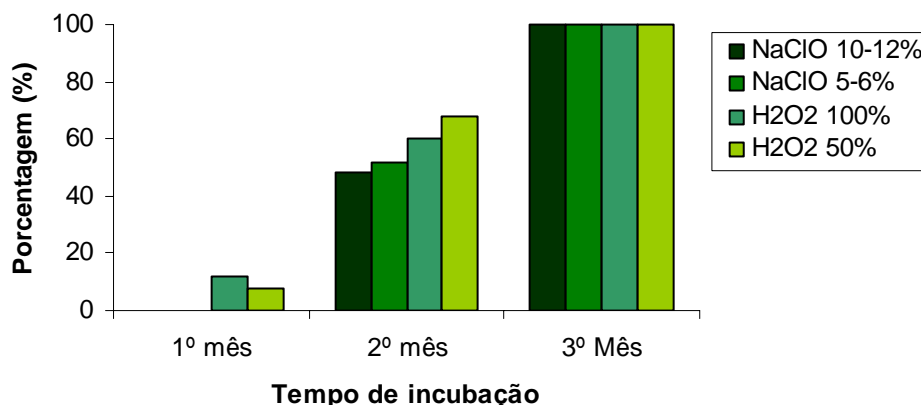


Figura 1. Porcentagem de contaminação por bactérias em sementes de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em diferentes tempos de incubação.

**Experimento 2.** Nos tratamentos em que foi utilizado antibiótico, independente da sua localização, seja no meio de cultura ou na semente, a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram maiores, quando comparado, com o tratamento em que inexistia o uso de antibióticos. As melhores taxas de germinação e IVG foram encontradas no tratamento em que foi utilizado antibiótico apenas no meio de cultura, não diferindo dos demais (Tabela 2).

Para controle da contaminação por bactérias o tratamento onde se observou os melhores resultados foi aquele que os antibióticos estavam presentes apenas no meio de cultura. Supostamente, o resultado encontrado deve-se a localização das bactérias, que se encontram internamente nas sementes de Pequi. A semente ao absorver os nutrientes pode absorver também os antibióticos, logo o crescimento bacteriano interno é inibido, favorecendo a germinação das sementes. De acordo com a tabela 1 as bactérias podem ser inibidoras da germinação de pequi, pois todas as sementes passaram por submersão em solução de  $GA_3$  na concentração de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ , para superação de dormência fisiológica, conforme SANTOS (2004), e mesmo assim não houve germinação significativa no tratamento em que não foram utilizados os antibióticos.

SANTOS (2004) em seu trabalho obteve 100% de germinação, utilizando  $GA_3$  por apenas 24 hs, na mesma concentração deste trabalho, porém as sementes eram desprovidas do endocarpo.

Por outro lado a contaminação por fungos foi maior nos tratamentos em que houve maior controle de contaminação por bactérias, o que supostamente, deve-se à disponibilidade de alimento no ambiente, favorecendo então, apenas um tipo microrganismo.

## CONCLUSÃO

O experimento 1 apresentou contaminação total por bactérias, podendo essas serem endofíticas.

No experimento 2, observou-se que o uso de antibióticos não interfere negativamente na germinação e no índice de velocidade de germinação, porém a não utilização de antibióticos resultou a diminuição de aproximadamente 9 vezes quando comparado aos demais tratamentos.

Observou-se ainda que as bactérias, supostamente, de acordo com os resultados, podem ser inibidoras da germinação, pois quando não se utilizou antibióticos, houve baixa germinação e baixo índice de velocidade de germinação.

Tabela 2. Germinação de sementes de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.) em diferentes condições de inoculação em água destilada e autoclavada, acrescida de fungicidas.

Meio de cultura	Tratamento de Semente	
	Com Antibiótico	Sem Antibiótico
	Germinação%	
Com Antibiótico	26,7Aa <sup>z</sup>	33,32Aa
Sem Antibiótico	21,65Aa	3,33Bb
	Índice de Velocidade de Germinação	
Com Antibiótico	0,11Aa	0,15 Aa
Sem Antibiótico	0,08Aa	0,01Ab
	Contaminação por Bactérias%	
Com Antibiótico	13,32Aa	1,67Ba
Sem Antibiótico	8,32Aa	5,0Aa
	Contaminação por Fungos%	
Com Antibiótico	6,67Ba	39,95Aa
Sem Antibiótico	5,02Ba	51,67Ba

<sup>z</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p:343-345, 1998.

CHAVES, Anderson da Costa; Schuch, Márcia Wulff; Erig, Alan Cristiano. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, nov./dez., 2005

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

SANTOS, Breno Régis. Micropropagação de Pequi ( *Caryocar Brasiliense* Camb.). **Tese – UFLA**. Lavras: UFLA, 2005.

SATO, Aurora Yoshiko, Dias, Herly Carlos Teixeira; Andrade, Leonaldo Alves De; Souza, Vênia Camelo De; Dornelas, Genaro Viana. Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau de alho ( *Galesia gorazema* Moq.), **Agropecuária Técnica**, v.25, n.2, p.65-70, 2004.

SILVA, D.B. da; SILVA, A.S. da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. de. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.1- 179.

**Palavras-chave:** *Caryocar brasiliense* Camb., Desinfestação, in vitro.