

CIRCULAR TÉCNICA

n. 373 - setembro 2022

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



Secretaria de Agricultura,
Pecuária e Abastecimento
Estado de Minas Gerais

Influência do ácido naftalenoacético (ANA) e do carvão ativado no alongamento de explantes de pequizeiro estabelecidos in vitro¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe²
Geisla Garcia Lea³
Amanda Daniele Cardoso Barbosa⁴
Joana D'Ark Nunes da Silva Lima⁵
Débora Ferreira de Souza⁶
Warley Rafael Oliva Brandão⁷

INTRODUÇÃO

O Cerrado é a maior região de savana tropical da América do Sul e o segundo bioma brasileiro em extensão. Ocupa aproximadamente 24% do território brasileiro, possuindo uma área total estimada em 2.036.448 km². A área abrange o Distrito Federal e dez Estados: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Bahia, Piauí, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, somando aproximadamente 1.330 municípios (IBGE, 2010).

Segundo Ribeiro e Walter (2008), a diversidade de fisionomias do Cerrado pode ser verificada pela existência de 11 tipos principais de vegetação. Existem as formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), as savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e as campestres (Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre).

O Brasil possui ampla diversidade de espécies vegetais oleaginosas, as quais podem ser encon-

tradas distribuídas por todo o território nacional. O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.) é uma dessas espécies, sendo considerado símbolo das regiões de Cerrado e que apresenta importância econômica e social.

A família Caryocaraceae inclui dois gêneros e cerca de 25 espécies, mas no Brasil ocorrem dois gêneros e 13 espécies, sendo dez espécies do gênero *Caryocar* e três do gênero *Anthodiscus* (SOUZA; LORENZI, 2005).

O pequi é considerado uma das espécies nativas do Cerrado de maior interesse econômico, principalmente devido ao uso do fruto na culinária, à extração de óleos para a fabricação de cosméticos e às propriedades terapêuticas (ALMEIDA; SILVA, 1994). Na medicina popular, é utilizado para o tratamento de problemas respiratórios e como afrodisíaco, e as folhas são adstringentes, além de estimularem a produção de bilis (ALMEIDA; SILVA, 1994; BRANDÃO; LACA-BUENDIA; MACEDO, 2002).

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte - CEGR, (38) 3834-1760, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte - CEGR, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Janaúba, MG, geislagarcialealrpm@hotmail.com.

⁴Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Janaúba, MG, ad320095@gmail.com.

⁵Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Janaúba, MG, joanadark93_@hotmail.com.

⁶Graduanda Agronomia UNIMONTES, Campus Janaúba, Janaúba, MG, fdesouza@gmail.com.

⁷Eng. Agrônomo, Doutorando Produção Vegetal UNIMONTES, Campus Janaúba, Janaúba, MG, warley.brandao@ifap.edu.br.

O pequizeiro é uma frutífera de grande importância na região Norte de Minas, onde o extrativismo dos frutos é de significativa relevância para a alimentação do sertanejo, além de constituir fonte de renda (CHÉVEZ POZO, 1997). Para os produtores rurais do Norte de Minas Gerais, o pequi contribui com 17,73% da renda familiar, atrás apenas do feijão (33,52%) e da mandioca (32,64%) (CHÉVEZ POZO, 1997).

Do pequizeiro utilizam-se todas as partes (madeira, casca, folhas, raiz, fruto e amêndoa), com emprego específico (móveis, tintas, ornamentação, uso medicinal, na indústria cosmética e na alimentação) (MARQUES, 2001; SANTOS, 2004).

À medida que ocorre a destruição das vegetações nativas, especialmente por conta do desmatamento, da expansão das cidades dentro do bioma Cerrado, e do extrativismo intensivo dos frutos do pequi, dentre outros problemas, conseqüentemente, há maior ameaça da conservação da variabilidade genética do pequizeiro.

Em função disso, o extrativismo excessivo do pequizeiro pode propiciar perdas de material genético da espécie, sendo que praticamente toda a coleta é destinada à comercialização e ao consumo, inclusive frutos originados de genótipos de alta qualidade, o que impede a sua proliferação natural.

Esta Circular Técnica traz uma abordagem sobre a influência de fitorreguladores na micropropagação de segmentos nodais provenientes de sementes estabelecidas *in vitro*.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Labbiotec) do Campo Experimental do Gorutuba (CEGR) da EPAMIG Norte, em Nova Porteirinha, MG.

Foram colhidos frutos de pequizeiros, oriundos de plantas-matrizes com características agronomicamente superiores, situados no Norte de Minas Gerais, nas proximidades do município de Montes Claros. Os frutos, após a colheita, foram transportados para o Laboratório, depois de uma seleção visual daqueles isentos de sintomas causados por doenças. Em seguida, os frutos foram submetidos à limpeza, descascados e despulpados manualmente. Os caroços obtidos foram levados para desidratação sob luz solar e em local ventilado, durante um período de 30 dias.

Após esse período, procedeu-se à escarificação física, pela remoção da casca seca, do mesocar-

po e dos espinhos, com auxílio de um esmeril. Em seguida, o material foi conduzido ao Laboratório, e a retirada do endocarpo foi realizada com um alicate. Optou-se por continuar a escarificação física com uma ferramenta menor, para obter maior controle manual e não danificar a semente, depois da retirada total do endocarpo.

As sementes, também chamadas amêndoas ou putâmens, foram levadas para embebição em solução aquosa de ácido giberélico (AG₃), na concentração de 350 mg/L, durante 24 horas, visando aumentar a porcentagem de germinação *in vitro* (BERNARDES *et al.*, 2008).

Em câmara de fluxo laminar, foi realizado o processo de desinfestação das amêndoas, imergindo-as por 1 minuto em álcool 70%. Em seguida, realizou-se uma nova imersão, durante 10 minutos, em hipoclorito de sódio (NaClO) (1,5% a 2,0% – concentração comercial) e, posteriormente, a tríplex lavagem com água destilada e autoclavada.

Após todas essas etapas, as sementes do pequizeiro foram colocadas em frascos autoclavados, contendo meio Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980) acrescidos por 800 mg/L de ácido ascórbico, 400 mg/L de polivinilpirrolidona (PVP) e 7,0 g/L de ágar. O pH do meio WPM foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 120 °C por 20 minutos. Os frascos foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 °C ± 1 °C. Após um período de 30 dias, algumas sementes germinaram *in vitro*, outras sofreram oxidação, e outras, contaminações fúngica e/ou bacteriana. As plântulas normais, com ausência de sintomas e/ou sinais de patógenos, foram selecionadas para servirem de material biológico para a composição do experimento de indução *in vitro*.

Estabelecimento *in vitro* de sementes do pequizeiro e segmentos nodais

Após a avaliação do número de brotações, os explantes de pequizeiro permaneceram em meio WPM padrão, ou seja, sem a presença de reguladores de crescimento por 30 dias, a fim de padronizar as condições de cultivo *in vitro* para a continuidade do estudo. Após esse período, foram selecionadas as brotações que apresentavam melhor vigor vegetativo, as quais foram repicadas em segmentos nodais com auxílio de bisturi e de pinça, constantemente esterilizados.

Os segmentos nodais obtidos foram colocados em tubos de ensaios, contendo 40 mL de meio WPM

(LLOYD; MCCOWN, 1980), acrescidos por 30 g/L de sacarose, 800 mg/L de ácido ascórbico, 400 mg/L de PVP, 7,0 g/L de ágar, e concentrações de carvão ativado combinadas com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA), as quais consistiram os tratamentos deste estudo. O pH do meio WPM foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (120 °C e 1 atm por 20 minutos). Os explantes mantiveram-se em presença de luz com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C ± 1 °C, e com irradiância de fótons de 36 µmol m²/s em sala de crescimento. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) experimental, em esquema fatorial 5 x 3, com cinco concentrações de ANA (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L), três concentrações de carvão ativado (0; 2,0; 4,0 g/L) e cinco repetições.

Análise estatística

Aos 45 dias após a implantação do experimento, foram avaliadas as variáveis alongamento dos explantes (mm), com auxílio de paquímetro digital, presença ou ausência de enraizamento e oxidação. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Com relação à variável “alongamento” e segundo à análise de variância, verificou-se efeito significativo apenas para o tratamento com carvão ativado, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise da variância dos tratamentos com ácido naftalenoacético (ANA), carvão ativado, e interação ANA com carvão ativado em explantes de pequiizeiro cultivados in vitro

FV	GL	QM
ANA	4	68.902662 ^{ns}
Carvão ativado	2	174.426801*
ANA*Carvão ativado	8	58.536373 ^{ns}
Erro estatístico	60	44.989935
Total corrigido	74	-
CV (%)	61,54	-

Fonte: Elaboração dos autores.

Nota: Dados referentes aos tratamentos com ácido naftalenoacético (ANA) e carvão ativado.

FV - Fonte de variação; GL - Grau de liberdade; QM - Quadrado médio; CV - Coeficiente de variação; ns - não significativo; * Significativo a 5%.

O coeficiente de variação (CV) apresentou valor superior, provavelmente por este tipo de estudo não proporcionar uma elevada padronização dos explantes, pois estes variaram moderadamente na forma e no comprimento, afetando a homogeneidade dos tratamentos. Dessa forma, cada explante pode apresentar um comportamento diferente, acarretando em elevado valor de CV.

Os efeitos positivos do carvão ativado estão relacionados, principalmente, com a função de reter substâncias tóxicas presentes no meio de cultura, como por exemplo, o 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), que é produzido a partir da desidratação da sacarose no momento da autoclavagem, ou substâncias inibitórias presentes no ágar, ou também por reduzir a ação de metabólitos tóxicos, tais como substâncias fenólicas, etileno e ácido abscísico (ABA) que são eliminados pelo explante (PAN; STADEN, 1998; THOMAS, 2008).

Ao analisar isoladamente o efeito do ANA e da interação ANA x carvão ativado, não foi observado efeito significativo no alongamento dos explantes do pequiizeiro (Tabela 2).

Observa-se que a concentração de 4 g/L de carvão ativado promoveu maior alongamento dos explantes in vitro, com média de 13,65 mm de comprimento do caule de pequiizeiro (Fig. 1), apesar de não ter diferido estatisticamente da concentração de 2 g/L de carvão ativado, que promoveu um alongamento de 10,65 mm dos explantes in vitro. Embora a maior concentração de carvão ativado testada proporcionar um maior alongamento dos explantes de pequiizeiro, o custo de produção in vitro de mudas deve ser analisado. É mais viável econômica e estatisticamente utilizar-se a concentração de 2 g/L de carvão ativado, uma vez que nesta fase reduzirá em 50% o uso e, conseqüentemente, o custo deste reagente.

Resultados semelhantes foram observados por Galdiano Júnior *et al.* (2012), que obtiveram maior eficiência de desenvolvimento in vitro das plântulas de *Cattleya loddigesii*, com o uso do meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado de carvão ativado e sob luz branca. Gomes *et al.* (2010) obtiveram maior eficiência de desenvolvimento in vitro na formação de raízes em explantes de *Maclura tinctoria* L., ao combinarem carvão ativado com a auxina ácido indol-3-butírico – ácido indolbutírico (AIB).

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que o ANA, analisado isoladamente e em interação com carvão ativado, não apresentou significância no

Tabela 2 - Comprimento de explantes de pequiheiro em função da interação ANA x carvão ativado aos 45 dias de cultivo in vitro

ANA (mg/L)	Carvão ativado (g/L)			
	0	2	4	Média
	Comprimento da parte aérea (mm)			
0	9,03 a	6,79 a	8,07 a	7,96 a
1	8,81 a	5,87 a	14,9 a	9,86 a
2	7,45 a	18,61 a	15,15 a	13,74 a
3	8,77 a	12,12 a	13,66 a	11,52 a
4	7,86 a	9,85 a	16,47 a	11,39 a
Média	8,38 B	10,65 AB	13,65 A	

Fonte: Elaboração dos autores.

Nota: Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

ANA - Ácido naftalenoacético.

Figura 1 - Explante de pequiheiro



Warley Rafael Oliva Brandão

Nota: Cultivado em meio Wood Plant Medium (WPM) acrescido por 4,0 g/L de carvão ativado apresentando alongamento do caule (seta).

alongamento dos explantes de pequiheiro. Possivelmente, a concentração testada deste regulador pode não ter sido ideal para tal efeito, ou porque, especificamente esta auxina, não conseguiu proporcionar os resultados esperados. Além disso, alguns tecidos são totalmente dependentes da presença de reguladores para regenerar e outros são autossuficientes (GEORGE, 1993).

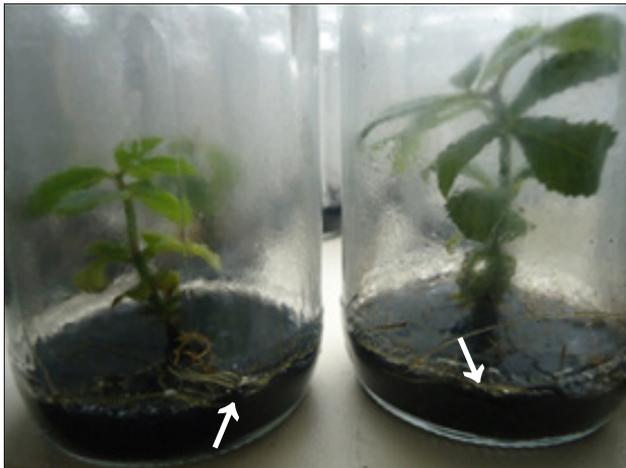
Com relação à variável enraizamento, até o período de avaliação não foi verificada a formação de raízes em nenhum dos tratamentos. Santos *et al.* (2006) ao verificarem o efeito da auxina AIB e carvão ativado sobre a rizogênese in vitro do pequiheiro, constataram que este regulador é essencial no processo de indução de raízes em brotações desta espécie vegetal. Como diferentes auxinas têm respostas diferentes in vitro, a presença de uma ou outra possivelmente ocasionará efeitos divergentes. Provavelmente, o tempo em que estes explantes ficaram expostos à luz na sala de crescimento pode não ter sido, ainda, suficiente para que o regulador de crescimento desse continuidade aos processos metabólicos da planta, e esta desenvolvesse o seu sistema radicular.

A formação de raízes foi observada após um período de 80 dias em que alguns tratamentos permaneceram em contato com o meio WPM, contendo carvão ativado e sob luz branca (Fig. 2), entretanto, a quantidade destas não foi suficiente para proceder à análise estatística.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), geralmente o enraizamento de espécies herbáceas é fácil, porém, o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas. O enraizamento de lenhosas é dependente da relação entre os níveis de auxina e citocinina, da participação de outras substâncias reguladoras de crescimento, da influência de cofatores e de fatores fisiológicos e externos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Gomes (1999) relata que o carvão ativado é muito importante para indução da rizogênese in vitro, uma vez que apresenta a capacidade de fixar auxinas e reter fenóis, sendo, de forma geral, benéfico, por promover o alongamento das raízes. Neste estudo,

Figura 2 - Explantes de pequi subcultivados em meio Wood Plant Medium (WPM) acrescido por carvão ativado



Wartley Rafael Oliva Brandão

Nota: Apresentando enraizamento (setas).

não foi observada a formação de raízes em nenhum dos tratamentos em que os meios eram isentos de carvão ativado. Em algumas espécies, o carvão ativado pode beneficiar o enraizamento, por meio da remoção dos inibidores da rizogênese que são liberados por alguns explantes, ou por alguns compostos presentes no meio de cultura (ARDITTI; ERNST, 1992; GEORGE, 1993; PAN; STADEN, 1998).

Gomes *et al.* (2010) obtiveram indução satisfatória de rizogênese in vitro na espécie lenhosa *M. tinctoria* L., na interação representada por 23,62 µM de AIB com 4,7 g/L de carvão ativado em meio WPM. O carvão ativado reduziu a ação dos metabólitos tóxicos liberados pelo explante, aumentando a superfície de contato com o meio WPM, podendo ter possibilitado bom enraizamento. McCown (1988) acredita que a redução da atividade peroxidase em meio WPM promove bons níveis de enraizamento in vitro do explante. Espécies nativas e lenhosas, como o pequi, apresentam dificuldade no estabelecimento e no enraizamento in vitro, em decorrência principalmente, embora não presente neste estudo, da oxidação e da contaminação (SATO *et al.*, 2001).

Com relação à variável oxidação, esta característica não esteve presente de maneira significativa nos tratamentos. Provavelmente, a presença do carvão ativado no meio WPM controlou efetivamente a oxidação de compostos fenólicos liberados pelas células do explante.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio WPM, associado a 2,0 g/L e 4,0 g/L de carvão ativado, foi eficiente em promover alonga-

mento caulinar no pequi in vitro, no entanto, para fins de diminuição de gastos em laboratórios de cultura de tecidos, recomenda-se a utilização de 2,0 g/L do carvão ativado.

Não houve interação da auxina com o carvão ativado, nas doses testadas em meio WPM, para a promoção da morfogênese in vitro.

Raízes in vitro foram desenvolvidas em tempo superior ao avaliado no experimento, evidenciando que para o processo de rizogênese é necessário maior tempo de avaliação para explantes de pequi.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.P. de; SILVA, J.A. da. **Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos Cerrados**. Brasília, DF: Embrapa CPAC, 1994. 38p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley and Sons, 1992. 682p.
- ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 1998. v.1, p.261-296.
- BERNARDES, T.G. *et al.* Propagação sexuada do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) estimulada por ácido. **Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.38, n.2, p.71-77, abr./jun. 2008. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/4154>. Acesso em: 16 set. 2022.
- BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J.P.; MACEDO, J.F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528p.
- CHÉVEZPOZO, O.V. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado do Norte de Minas Gerais**. 1997. 100f. Dissertação (Mestrado em Administração Rural) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.
- GALDIANO JÚNIOR, R.F. *et al.* Crescimento in vitro e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.801-807, maio 2012.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd ed. Westbury: Exegetics Limited, 1993. 574p. Part 1: The technology.

- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Macluratinctoria*)**. 1999. 92f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- GOMES, G.A.C. *et al.* Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered wood species. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.34, n.1, p.25-30, 2010.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 1998. v.1, p.183-260.
- IBGE. **Produção da extração vegetal e silvicultura - PEVS 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. v. 25.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- MARQUES, M.C.S. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. *In*: DAVIS, T.M.; HAISSIG, B.H.; SANKLA, N. (ed.) **Adventitious formation in cuttings**. Portland: Discorides Press, 1988. p.247-260.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- PAN, M.J.; STADEN, J.V. The use of charcoal in vitro culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, Dec. 1998.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. *In*: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. de; RIBEIRO, J.F. (ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. Embrapa Cerrados, 2008. v.1, cap.6, p.151-212.
- SANTOS, B.R. **Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2004. 239f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- SANTOS, B.R. *et al.* Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.293-296, ago. 2006.
- SATO, A.Y. *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p.618-631, Nov./Dec. 2008.