

## EFEITO DE FUNGICIDAS NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE COQUINHO-AZEDO

*Effects of fungicides in in vitro cultivation of embryos of coquinho-azedo*

Ana Íris Ribeiro de Castro Souza<sup>1</sup>

Silma da Conceição Neves<sup>2</sup>

Priscila Oliveira Silva<sup>3</sup>

Itaina Gonçalves Andrade<sup>3</sup>

Leonardo Monteiro Ribeiro<sup>4</sup>

Paulo Sérgio Nascimento Lopes<sup>5</sup>

**Resumo: Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos fungicidas carboxin-thiran e thiabendazol no cultivo *in vitro* de embriões de coquinho-azedo *Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae). **Metodologia:** Os embriões foram inoculados em meio contendo sais Murashige & Skoog (MS), vitaminas, caseína hidrolisada, sacarose, carvão ativado e ágar. Testou-se doses de 0; 0,1; 0,2; 0,5 e 1% de carboxin-thiram na solução de imersão para desinfestação das sementes e de 0; 1; 10; 50; 100 e 500 ppm de thiabendazol adicionado ao meio de cultivo. **Resultados:** Os fungicidas não influenciaram a contaminação fúngica. O tratamento das sementes com carboxim-thiram não influenciou a germinação e o desenvolvimento de plântulas. **Conclusão:** A dose de 500 ppm de thiabendazol reduziu a germinação e a emissão de raízes e bainhas foliares pelas plântulas, o que pode estar relacionado a efeito fitotóxico.

**Palavras-chave:** *Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae). Thiabendazol. Carboxin-thiran. Germinação *in vitro*.

**Abstract: Objective:** This study aimed to evaluate the effects of fungicides carboxin-thiran and thiabendazole in the *in vitro* cultivation of embryos of *Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae). **Methods:** The embryos were inoculated in media with MS salts, vitamins, hidrolized caseine, sucrose, activated charcoal and agar. Were evaluated levels of 0, 0.1, 0.2, 0.5 and 1% of carboxin-thiran in immersion solution to seed disinfestation treatment and of 0, 1, 10, 50, 100 and 500 ppm of thiabendazole which were added to the culture medium. **Results:** The fungicides did not affect the fungical contamination. The seeds treatment with carboxin-thiran did not affect the germination and the seedlings development. **Conclusion:** The level of 500 ppm of thiabendazole provided lowest results of germination and seedlings development, which may be related to phytotoxic effect.

**Keywords:** *Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae). Thiabendazole. Carboxin-thiran. *In vitro* germination.

1 Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes.

2 Mestre em Ciências Biológicas pela Unimontes.

3 Graduanda em Ciências Biológicas pela Unimontes.

4 Pós-Doutor em Ciências Biológicas pela Universitat de Barcelona. Professor da Unimontes.

5 Pós-Doutor em Ciências Agrárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

## INTRODUÇÃO

*Butia capitata* (Mart) Becc. (Arecaceae) é uma palmeira nativa do bioma Cerrado, endêmica do norte de Minas Gerais, sudoeste da Bahia e nordeste de Goiás.<sup>1</sup> No norte de Minas Gerais, a espécie é conhecida popularmente como coquinho-azedo e seus frutos são utilizados para a fabricação de sucos e sorvetes. A espécie se encontra ameaçada pelo desmatamento, pelo consumo de suas flores e frutos por bovinos e equinos e pelo extrativismo predatório.<sup>2</sup> A geração de tecnologias para produção de mudas de *B. capitata* é importante, para a viabilização da implantação de cultivos comerciais e para o incremento de populações naturais. Porém, existem dificuldades neste sentido, uma vez que as sementes germinam em baixos níveis, devido a ocorrência de dormência fisiológica não profunda.<sup>1,3,4</sup>

As palmeiras são propagadas normalmente por sementes.<sup>5</sup> O diásporo do grupo é geralmente composto de um endocarpo com uma a três sementes, cuja constituição rígida estabelece uma barreira física para a germinação.<sup>1,3,5,6</sup> A semente de muitas espécies é oleosa e densa e o embrião encontra-se inserido no endosperma consistindo em um eixo embrionário envolvido por uma folha cotiledonar simples.<sup>1,6,7</sup> As sementes em Arecaceae, normalmente, têm índice de germinação baixo, e o tempo necessário para a germinação varia, conforme a espécie, de semanas a anos.<sup>1,3,5,6,8</sup>

O cultivo do embrião isolado em meios de cultura adequados, para muitas espécies, proporciona a superação da dormência e a germinação em níveis elevados, contribuindo para a produção de mudas em larga escala e em curto espaço de tempo.<sup>7,9</sup> Além disto, o cultivo de embriões *in vitro* contribui para a ampliação dos conhecimentos sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas, considerando-se o controle ambiental e de aspectos

nutricionais.<sup>10,11</sup> Entretanto, a viabilidade da utilização dessas técnicas em larga escala requer o estabelecimento de protocolos eficientes para a germinação dos embriões, desenvolvimento das plântulas e aclimatização em condições *in vivo*.<sup>12</sup>

Dentre os fatores que afetam a produção de mudas, para a implantação de cultivos, destacam-se o decréscimo da qualidade da semente e as doenças causadas durante o processo de germinação, ambas causadas principalmente por fungos.<sup>6,13</sup> Por outro lado, a contaminação fúngica é um dos principais problemas relacionados à cultura de embriões em geral.<sup>10,14</sup> e também no caso de embriões de palmeiras.<sup>15</sup>

A associação entre os fungicidas carboxin e thiran tem sido utilizada para controle dos patógenos presentes no solo e nas sementes. Estudos têm evidenciado que, em muitos casos, os fungicidas proporcionam incremento na germinação e diminuem a mortalidade das plântulas.<sup>8</sup> O thiabendazol é um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis, com largo espectro de controle e rápida absorção na planta, e tem sido utilizado para controle de doenças de plântulas durante o processo de germinação.<sup>13</sup>

A intensidade do tratamento de desinfestação de sementes e embriões normalmente afeta a germinação e o desenvolvimento de plântulas no cultivo *in vitro*, sendo que diversos desinfestantes e antimicrobianos produzem efeitos fitotóxicos, dependendo da dosagem.<sup>15,16</sup> Neste sentido, a determinação da concentração de substâncias usadas no controle da contaminação microbiana é importante para o estabelecimento de protocolos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de concentrações dos fungicidas thiabendazol e carboxin-thiran na contaminação fúngica, na germinação *in vitro* de embriões e no desenvolvimento de plântulas de *Butia capitata*.

## METODOLOGIA

Frutos maduros (epicarpo completamente amarelo) foram adquiridos na central de abastecimento (Ceanorte) em Montes Claros – MG. O material foi conduzido ao viveiro da Unimontes e selecionado, com descarte daqueles frutos que apresentavam sintomas de ataque de insetos e microrganismos. Os frutos foram despulpados manualmente e os pirênios (sementes envolvidas pelo endocarpo) foram mantidos à sombra e deixados secar durante quatro dias. No quinto dia, eles foram levados ao Laboratório de Micropropagação da Unimontes e as sementes foram retiradas do endocarpo com auxílio de torno de mesa.

Para avaliação do efeito do carboxin-thiran, foram utilizadas 400 sementes. Estas foram imersas em soluções do fungicida carboxin-thiram (Vitavax-thiran) nas concentrações de: 0; 0,1; 0,5; 0,2 e 1%; em 100 ml de água destilada em recipientes de vidro com sistema de aeração, durante 12 horas. As sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar onde os embriões foram excisados, dispostos em solução de 100 ppm de ácido ascórbico, desinfestados em solução de 0,5% de Cl<sub>2</sub>, por 10 minutos e inoculados em copinhos de plástico com capacidade de 50 ml, previamente desinfestados em solução de 6 % de Cl<sub>2</sub>, contendo 10 mL de meio de cultura com os seguintes componentes: sais MS com 75% da concentração original; 0,4 mg/L de tiamina, 1 mg/L de piridoxina; 0,5 mg/L de ácido nicotínico; 100 mg/L de mio-inositol; 0,5 g/L de caseína hidrolizada; 3g/L de carvão ativado; 30 g/L de sacarose; 6g/L de ágar; pH ajustado para 5,7 (Ribeiro et al.,2011a). Os recipientes foram totalmente cobertos com papel alumínio para que

a germinação ocorresse na ausência de luz. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso com cinco tratamentos (doses do fungicida) e oito repetições de dez recipientes, contendo um embrião em cada. O cultivo foi conduzido a 25° C em condição de laboratório.

O experimento foi avaliado após 30 dias da inoculação quanto à ocorrência de contaminação fúngica (avaliado pela presença de micélio fúngico no embrião, plântula ou meio de cultivo), oxidação (avaliada pelo escurecimento das estruturas do embrião ou plântula), germinação (avaliada pelo alongamento igual ou superior a 5mm do pecíolo cotiledonar) e quanto aos parâmetros relacionados ao desenvolvimento das plântulas (emissão de bainhas foliares e da raiz primária).

Os dados foram coletados por contagem e convertidos em percentuais, sendo estes transformados em arco seno  $(X/100)^{0.5}$  para as comparações. Foi realizada a análise de variância e quando detectada diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no o programa estatístico SAS – The SAS System for Windows Version 8.<sup>17</sup>

Para avaliação do efeito do thiabendazol, foi preparado meio de cultura com a mesma composição descrita anteriormente. Após a autoclavagem do meio, o mesmo foi colocado em banho-maria até que atingisse a temperatura de 50°C. Em seguida, foi adicionado ao meio o fungicida thiabendazol (Tecto) nas concentrações de 0; 1; 10; 50; 100 e 500 ppm dentro da câmara de fluxo laminar. O meio de cultura foi transferido para recipientes plásticos e a obtenção dos embriões, assepsia e cultivo seguiram os mesmos procedimentos descritos no experimento anterior. O experimento

foi realizado em delineamento em blocos ao acaso com seis tratamentos (doses de thiabendazol) e oito repetições de dez recipientes com um embrião cada.

A avaliação ocorreu após 30 dias de inoculação dos embriões, seguindo os mesmos critérios do experimento com carboxin-thiram.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento de carboxin-thiran não afetou nenhuma das características avaliadas, inclusive a contaminação fúngica (Tabela 1).

Bittencourt (2007)<sup>18</sup>, em experimento com o fungicida carboxin-thiran aplicado no tratamento de sementes de amendoim, observou que houve controle eficiente dos patógenos presentes nas sementes, exceto no caso de *Rhizopus* sp e não constatou efeito fitotóxico do fungicida. No presente trabalho, a baixa contaminação, mesmo no tratamento controle, proporcionada pela adequação dos procedimentos de assepsia, não permitiram uma avaliação adequada do efeito do fungicida no controle da mesma. Por outro lado, foi possível verificar a ausência de efeitos fitotóxicos nas doses utilizadas.

**Tabela 1-** Percentagem média das características avaliadas no cultivo *in vitro* de embriões de sementes de *B. capitata* desinfestadas com carboxin-thiran.

	Contaminação fúngica (%)	Alongamento (%)	Emissão de bainhas foliares (%)	Emissão de raízes (%)
Média	5,9	50,75	25,75	17,2
p	0,76	0,13	0,19	0,76
CV	139,53	37,2	78,98	100,6

p = nível de significância.

CV = coeficiente de variação

Na avaliação do efeito do thiabendazol (Figura 1), os tratamentos não afetaram a contaminação fúngica ( $p= 0,63$ ,  $CV= 46,79$ ). A média geral de contaminação de embriões, plântulas ou meio de cultura foi elevada, 47,5%. Esta situação indica a necessidade de maior adequação da metodologia de assepsia e desinfestação para a cultura de embriões de *Butia capitata*. Por outro lado, é possível observar que, os procedimentos de introdução do fungicida no meio podem ter concorrido para uma maior contaminação do que a observada no experimento com carboxin-thiram. Isto se deu devido ao fato do fungicida não poder ser autoclavado, o que obriga a execução de seu acréscimo a frio e a conseqüente maior exposição do meio à contaminação ambiental.

Miranda e Souza<sup>13</sup> constataram o efeito positivo de thiabendazol na germinação de sementes de soja. Porém, outros trabalhos não mostraram efeito significativo como o de Tavares e Souza<sup>19</sup>, que observaram que fungicidas do grupo dos benzimidazóis (tiofanato metílico e thiabendazol) foram ineficientes no controle micelial do *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L).

Houve efeito dos tratamentos com thiabendazol sobre o percentual de embriões alongados ( $p= 0,0018$ ;  $CV= 40,15$ ), sobre a emissão de raízes, ( $p < 0,0001$ ;  $CV= 49,20$ ) e sobre a emissão de bainhas foliares ( $p= 0,0012$ ;  $CV= 53,1$ ) (Figura 1).

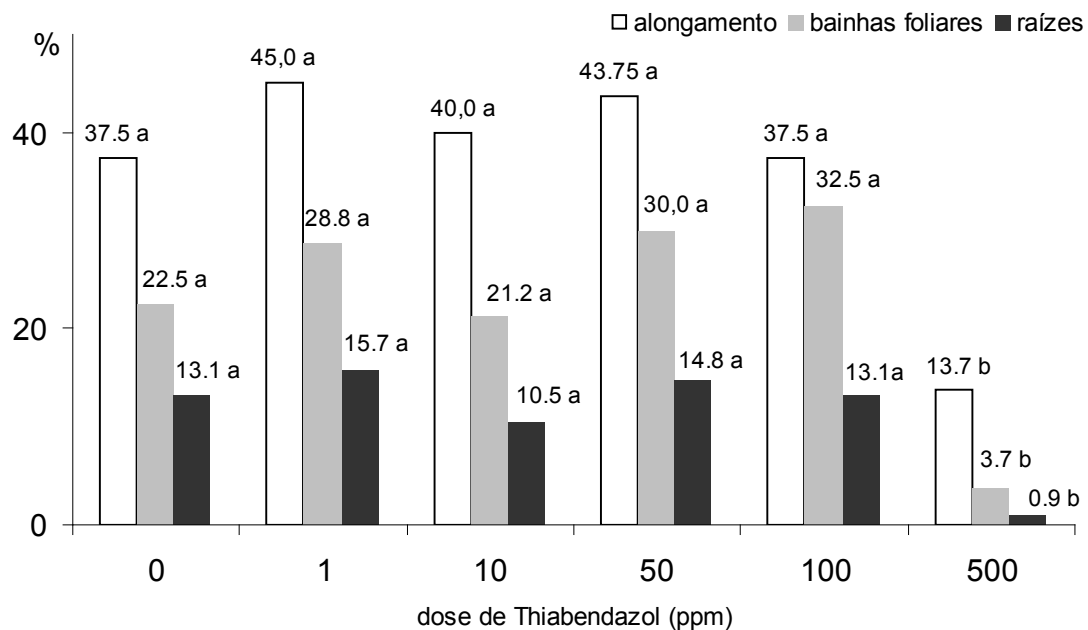
**Efeito de thiabendazol sobre o cultivo in vitro de *Butia capitata***

Figura 1 Efeito de doses de thiabendazol sobre o alongamento de embriões e emissão de bainhas foliares e de raízes por plântulas de *Butia capitata* cultivados *in vitro*.

Não houve diferença significativa para nenhuma variável ocasionada por tratamentos com doses iguais ou inferiores a 100 ppm de thiabendazol. Os tratamentos com concentrações 500 ppm de thiabendazol proporcionaram resultados inferiores em todas as variáveis, o que possivelmente está relacionado a efeito fitotóxico, pois ocorreu redução na germinação e emissão de raízes e bainhas pelas plântulas.

Pizzinatto *et al.*<sup>20</sup>, avaliando a sanidade e vigor das sementes e crescimento das plântulas da palmeira pupunheira (*Bactris gasipaes*), observaram que o fungicida thiram foi o que proporcionou o melhor tratamento químico de sementes e que os fungicidas thiabendazol e thiabendazol-thiran proporcionaram os piores resultados. Estes autores também mencionaram

que o thiabendazol não controlou eficientemente os principais microorganismos presentes nas sementes, afetou negativamente a germinação e ocasionou decréscimo de 13,54% no crescimento das mudas.

## CONCLUSÕES

O fungicida carboxin-thiran, utilizado na desinfestação das sementes, não afetou a contaminação fúngica, a germinação e o desenvolvimento de plântulas.

O fungicida thiabendazol, nas doses utilizadas, não foi eficiente no controle da contaminação fúngica e proporcionou efeito fitotóxico na concentração de 500 ppm.

## AGRADECIMENTOS

À Fapemig pela concessão de bolsas.

## REFERÊNCIAS

1. LORENZI, H. *et al.* *Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2004. 416 p.
2. MERCADANTE-SIMÕES, M.O. *et al.* Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. *Unimontes Científica*, Montes Claros, v.8, p.143-149, jul-dez, 2006.
3. BROCHAT, T. K. Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart) Becc. (pindo palm) seed germination. *HortTechnology*, v. 8, n. 4, p. 586-587, 1998.
4. MAGALHÃES, H.M. *et al.* Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees*, Berlin, v.27, n.1, p.273-283, jan-fev, 2013.
5. MEEROW, A.W. *Palm Seed Germination*. University of Florida. IFAS Extension. BUL 274, 2004. Disponível em: <<http://www.edis.iafas.ufl.edu>> Acesso em: 12 de Nov. 2008.
6. RIBEIRO, L.M. *et al.* Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Science & Technology*, Bassersdorf, v.39, n.2, p.303-317, mai-set, 2011a.
7. RIBEIRO, L.M. *et al.* Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae). *Trees*, Berlin, v.,26, n.2, 659-672, jun-jul, 2012.
8. PEDRON, F.A. *et al.* Parâmetros biométricos de fruto, endocarpo e semente de butiazeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.2, p.585-586, mar-abr, 2004.
9. CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: Ciência, tecnologia e produção*. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p.588.
10. HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.371-393.
11. RIBEIRO, L.M. *et al.* Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento in vitro de coquinhoazedo. *Revista Ceres*, Viçosa, v.58, n.2, p.133-139, mar-abr, 2011b.
12. LÉDO, A. da S. *et al.* Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.42, n.2, p.147-154, fev. 2007.
13. MIRANDA, T.R.; SOUZA, F.A. Efeito do tratamento com fungicida Thiabendazol na germinação de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*. v.2, n.1, p.35-42, 1980.
14. LONDE, L.N. *et al.* Efeito do Benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS, para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile*. (Anacardiaceae). *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.23, n.3, p.94-100, jul-set. 2007.
15. MELO, B. *Cultivo de embriões in vitro*



da guarirobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.]. 2000. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Lavras, Lavras.

16. NEVES, T.S. dos. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de diplóides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. *Revista brasileira de fruticultura*, Jaboticabal, v.24. n.1, 2002.

17. SAS INSTITUTE. *SAS User's guide: statistics version*. Cary: Statistical Analysis System Intitute, 1990. 846 p.

18. BITTENCOURT, S.R.M.de *et al.* Eficiência do fungicida carboxin + thiran no tratamento de sementes de amendoim. *Revista Brasileira de*

*Sementes*. Pelotas, v.29, n.2, ago. 2007.

19. TAVARES, G.M.; SOUZA, P.E. de. Efeito de Fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya*. L.) *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.29, n.1, p.52-59, jan-fev, 2005.

20. PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; SOAVE, J.; SPIERING, S.H.; BINOTTI, C.S. Tratamento químico de sementes de pupunheira, (*Bactris gasipaes*), efeitos na sanidade, germinação e vigor. *Summa Phytopathologica*, v.26, p.42-47, 2000.