



Efeito da concentração de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de *Brachiaria brizantha* para cultivo *in vitro*

Maurício Marini Köpp¹, Leiri Daiane Barili², Naine Martins do Vale², Gislayne A. Rodrigues Kelmer³, Aline Luciano Filgueiras³, Maria Coletta Vidigal¹, Leônidas Paixão Passos¹

¹ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – CNPGL, Juiz de Fora, MG. e-mail: kopp@cnpgl.embrapa.br

² Acadêmica do Curso de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV, Lages-SC.

³ Acadêmica do Curso de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, MG.

Resumo: A *Brachiaria brizantha* é uma das mais importantes forrageiras cultivadas no Brasil sendo responsável por grande parte da área coberta por pastagens. A utilização da biotecnologia está sendo cada vez mais demandada no melhoramento vegetal e neste contexto a cultura de tecidos tem importante papel. A contaminação é um dos principais fatores que dificultam o cultivo *in vitro*, em especial quando se trata da introdução de sementes no meio de cultura, pois os agentes patogênicos dificultam a germinação bem como o desenvolvimento das plântulas. O objetivo do trabalho foi determinar a melhor concentração de hipoclorito de sódio para desinfestação de sementes para cultivo *in vitro* de *B. brizantha*. Foram utilizadas sementes da cultivar Marandu, as quais foram tratadas com três concentrações do agente, 1%, 1,5% e 2%, durante 16 horas de submersão. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Após tratadas, as sementes foram introduzidas em meio de cultivo sob condições assépticas e mantidas em câmara de crescimento. As observações foram realizadas aos sete dias e o tratamento que apresentou a melhor porcentagem de germinação e menor contaminação, foi com a concentração de 2% de hipoclorito de sódio.

Palavras-chave: desinfestação, cultura de tecidos, germinação, sementes

Effects of sodium hypochlorite concentration on the disinfection of *Brachiaria brizantha* seeds destined for *in vitro* culturing

Abstract: Most of the Brazilian grassland area is covered with *Brachiaria brizantha*, and the use of biotechnological procedures, such as tissue culture, is a growing need, in order to expedite the *Brachiaria* genetic breeding programs. Microorganism contamination is one of the major procedural constraints for plant *in vitro* culturing, particularly if seeds are to be introduced in the culture medium, as both germination and seedling growth might be depressed. The purpose of this study was to determine the best sodium hypochlorite concentration for an efficient disinfection of *B. brizantha* seeds destined for *in vitro* culturing. Seeds of cv. Marandu were kept immersed in 1, 1.5 or 2% sodium hypochlorite solution for 16 hours, and then harvested. Subsequently, those seeds were introduced in aseptic culture medium and maintained in a growth chamber for seven days. Evaluations were performed considering a completely randomized design, with four replications. The best percentage of seed germination and the least microorganism contamination were obtained with the 2% sodium hypochlorite solution.

Keywords: disinfection, germination, seeds, tissue culture

Introdução

A área cultivada com pastagem no Brasil duplicou nos últimos 20 anos, atingindo 100 milhões de hectares, com aproximadamente 60 milhões de hectares cultivados com *B. brizantha* cv. Marandu. Em virtude dos ganhos genéticos cada vez menores e mais dispendiosos, o uso de técnicas de biotecnologia vêm se tornando fundamentais no melhoramento genético vegetal (Santos et al., 2008). O cultivo *in vitro* é uma tecnologia que alia benefícios como avanço de gerações vegetativas em curto espaço de tempo, rápida multiplicação clonal e livre de patógenos, a obtenção de transgênicos, bancos de germoplasma dentre vários outros (Sousa et al., 2007).

Quando se trata de introdução de sementes no cultivo *in vitro* além da eficiência na desinfestação é necessário o uso de agentes que não afetem o potencial germinativo, para que a plântula formada a partir da germinação possa ser fonte de explante confiável. O agente desinfestante mais utilizado é o hipoclorito de sódio, porém a concentração e o tempo de exposição das sementes a estes compostos pode variar de acordo com a espécie e tecido a tratar (Montarroyos et al., 2004), sendo necessária, então, sua adequação de acordo sensibilidade do tecido a ser desinfestado. Desse modo, o trabalho teve como

objetivo determinar a concentração ideal de hipoclorito de sódio para a desinfestação de sementes de *B. brizantha*, visando fornecer material sadio para o cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas sementes de *B. brizantha* cv. Marandu. Inicialmente as sementes foram separadas em quatro amostras de 100 sementes as quais foram lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada por três vezes. As sementes foram imersas em álcool 70% durante 5 minutos. Em seguida foram submetidas à desinfestação com as soluções de: Hipoclorito de Sódio (ClNaO) nas concentrações de 1,0%, 1,5% e 2,0%, por 16 horas. A seguir as soluções foram drenadas e as sementes lavadas por três vezes consecutivas, em água destilada esterilizada em autoclave.

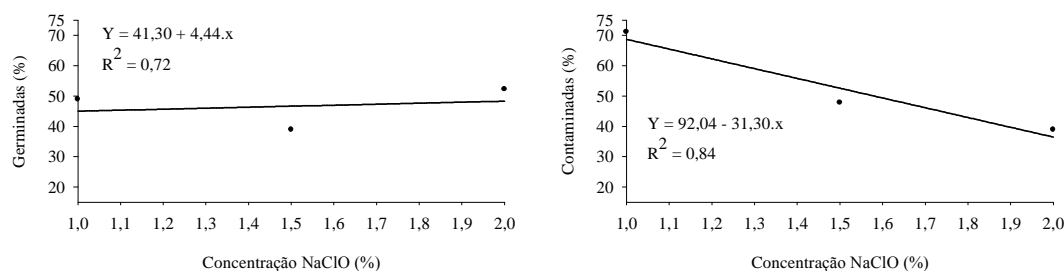
O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições em que as sementes foram equidistantemente distribuídas em recipientes contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 0,6% de ágar, 3% de sacarose e suplementado com 1 μ mol 6-benzilaminopurina (BAP) e 1 μ mol ácido naftalenoacético (ANA) mantidas em câmara com controle ambiental (240 mol/s.m² de irradiância, 30 \pm 4°C, 86 \pm 4% de U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

Após sete dias foram realizadas as avaliações de germinação e incidência de contaminação, as quais geraram as variáveis: i) germinadas, ii) contaminadas, iii) germinadas e contaminadas e iv) mortas e contaminadas, para que se obtenha as estimativas da influência da contaminação e doses (ClNaO) de sobre a germinação das sementes. Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando doses como fator fixo e a seguir, os efeitos das doses foram testados na análise de regressão, pela significância dos distintos graus do polinômio em função dos diferentes níveis (doses), sendo apresentados na forma de gráficos individuais para cada variável.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados obtidos foi realizada a análise de variância (dados não apresentados), no qual pode ser observado que o efeito da concentração de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes foi significativo a 5% de probabilidade de erro para todas as variáveis, exceto para “germinadas e contaminadas”. Ao se efetuar o ajuste de regressão polinomial, foi verificado que o melhor modelo de regressão foi linear para as para todas as variáveis cuja variação tenha sido significativa.

Na Figura 1 pode ser observado que concentrações elevadas do agente desinfestante proporcionaram um aumento na porcentagem de germinação das sementes. Esse resultado está associado ao aumento da concentração do agente o qual reduz a incidência de contaminação, responsável entre outros fatores pela diminuição do potencial germinativo das sementes. Fungos e bactérias podem promover a formação de plântulas anormais, ocasionando muitas vezes perda total da viabilidade ou impedindo o processo normal da germinação de sementes (Corder & Borges, 1999). Como pode ser observado na Figura 1, a menor incidência de contaminação foi acompanhada de aumento significativo na germinação. Também pode ser observado que o efeito das concentrações sobre a incidência de contaminação é bem maior do que sobre o aumento da germinação, com coeficientes de regressão de -31,30 e 4,44 respectivamente. Este resultado indica que a menor germinação sob baixas concentrações de hipoclorito de sódio não está diretamente associada ao alto índice de contaminação das sementes, mas também a outros fatores como tipo de contaminação. Montarroyos (2000) concluiu que fungos apresentam menor prejuízo na germinação, porém maior prejuízo no desenvolvimento das plântulas cultivadas *in vitro* quando comparados com a contaminação por bactérias. Baseado nestas observações pode ser levantada a hipótese de que o hipoclorito de sódio até doses de 2% apresenta maior eficiência na controle de fungos das sementes de *Brachiaria*.



Figural1 Efeito das concentrações de hipoclorito de sódio sob o percentual de sementes germinadas e contaminadas em sementes de *B. brizantha* cv. Marandu introduzidas em cultivo *in vitro*.

Analisando apenas as sementes contaminadas e separando-as em sementes germinadas contaminadas e sementes mortas contaminadas (Figura 2), pode ser observado que a porcentagem de sementes germinadas e contaminadas não foi alterada pelas concentrações de hipoclorito de sódio com média de 27,2%. O nível de contaminação incidente sobre a semente está inversamente relacionado com a capacidade e velocidade de germinação (Corder & Borges, 1999). Desta forma, associando os resultados da incidência de contaminação sobre as sementes tratadas (Figura 1) com o número de sementes germinadas e contaminadas fica evidente que uma porcentagem fixa de sementes contaminadas germina.

Por outro lado a porcentagem de sementes mortas e contaminadas decresceu com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio, evidenciando que o agente desinfestante, por diminuir a infestação proporciona uma menor porcentagem de mortalidade de sementes. A contaminação incidente sobre as sementes dificulta e até inviabiliza sua germinação, indicando que a concentração de 2,0% diminui a contaminação e aumenta a germinação. Couto et al.(2004) observou que as menores médias de contaminação por bactéria (9,52%) ocorreram quando as sementes foram desinfestadas com 2,5% de hipoclorito de sódio.

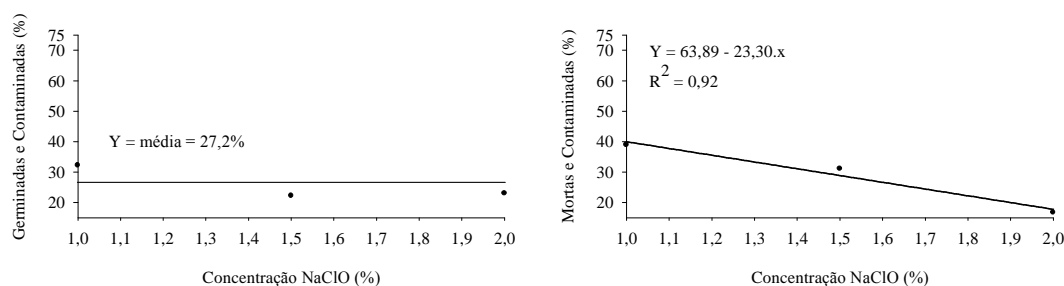


Figura2 Efeito das concentrações de hipoclorito de sódio sob o percentual de sementes germinadas contaminadas e mortas contaminadas em sementes de *B. brizantha* cv. Marandu introduzidas em cultivo *in vitro*.

A qualidade das sementes também é um fator decisivo em um estudo de desinfestação de sementes. Parte da ausência de germinação pode estar atribuída a falta prévia de qualidade da semente. As sementes utilizadas neste trabalho possuíam 98% de germinação, segundo estudo preliminar realizado. Desta forma, as baixas porcentagens de germinação obtidas neste estudo estão relacionadas à condição de germinação *in vitro*, as quais favorecem enormemente contaminação por microorganismos. Desta forma, a maior dose utilizada (2%), foi a que proporcionou melhores resultados sobre o estabelecimento de plântulas de *B. brizantha* em condições *in vitro*.

Conclusões

A concentração de 2% de hipoclorito de sódio sob 16 horas de submersão de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foi a que proporcionou a menor ocorrência de contaminação e um melhor percentual germinativo.

Literatura citada

- CORDER, M.P.M.; BORGES, J.N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Ciência Florestal**, v.9, n.2, p.1-7, 1999.
- COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). Viçosa-MG, v.28, n.5, p.633-642, 2004.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, v.36/37, p.5-10, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- SANTOS, J.P.; DORNELLES, A.L.C.; PEREIRA, F.D.P. et al. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, n.2, p.127-131, 2008.
- SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispata*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.405-407, 2007.