

EFEITO DO TEMPO DE AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE *Brachiaria brizantha* PARA CULTIVO *in vitro*

Maurício Marini Köpp¹, Rafael Marques², Leônidas Paixão Passos¹, Maria Coletta Vidigal¹, Fausto de Souza Sobrinho¹, Naine Martins do Vale³, Leiri Daiane Barili³, Gislayne Aparecida Rodrigues Kelmer² e Fabio de Souza Fernandes²

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo determinar o melhor tempo de imersão de sementes em hipoclorito de sódio para desinfestação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv Marandu para introdução em cultivo *in vitro*. Os tratamentos foram constituídos da imersão das sementes em hipoclorito de sódio 2,0%, por 8, 16 e 24 horas. A seguir, as sementes foram distribuídas em meio de cultivo e incubadas em câmara com controle ambiental. Foram avaliadas as variáveis: i) germinadas, ii) contaminadas, iii) germinadas e contaminadas e iv) mortas e contaminadas. A proporção de sementes contaminadas foi altamente influenciada pelo tempo de imersão das sementes no agente desinfestante, sendo o tempo 24 horas o mais eficiente em reduzir a contaminação das sementes. A maior porcentagem de germinação foi obtida com 12 horas e 47 min. sendo recomendado como protocolo eficiente para desinfestação de sementes de *B. brizantha* para introdução em cultivo *in vitro*.

Introdução

O gênero *Brachiaria* é responsável por 60% da área coberta por pastagens, sendo assim, a forrageira mais importante na produção pecuária nacional. Em virtude dos ganhos genéticos cada vez menores e mais dispendiosos, o uso de técnicas biotecnologia vêm se tornando fundamentais no melhoramento 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 podem variar de acordo com, a espécie e tecido a tratar (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), sendo necessária, então, sua adequação de acordo sensibilidade do tecido a ser desinfestado. Desse modo, o trabalho teve como objetivo determinar o tempo ideal de imersão de sementes de *Brachiaria brizantha* no agente desinfestante hipoclorito de sódio, visando fornecer fontes de explantes sadios para introduzir na técnica da micropropagação.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas sementes de *Brachiaria brizantha* cv Marandu. Inicialmente as sementes foram lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada por três vezes. A seguir as sementes foram imersas em álcool 70% durante 30 minutos e em seguida foram submetidas à desinfestação com a solução de: hipoclorito de sódio na concentração de 2,0%, por períodos de 8, 16 e 24 horas. Após transcorrido estes tempos, as soluções foram drenadas e as sementes lavadas por três vezes consecutivas, com água destilada esterilizada em autoclave em capela de fluxo laminar asséptica.

¹ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG. E-mail: kopp@cnpq.embrap.br.

² Acadêmico do Curso de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG. E-mail: rafamrq@gmail.com.

³ Acadêmico do Curso de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, SC.

Apoio financeiro: FAPEMIG e CNPq e UNIPASTO.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições em que as sementes foram equidistantemente distribuídas em recipientes contendo meio MS (MURASHIGE e 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 das 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 dos tempos de imersão sobre a germinação das sementes. Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando tempo como fator fixo e a seguir, os efeitos dos tempos foram testados na análise de regressão, pela significância dos distintos graus do polinômio em função dos diferentes níveis do fator tempo, sendo apresentados na forma de gráficos individuais para cada variável.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (dados não apresentados), no qual pode ser observado que o efeito do tempo de imersão das sementes em hipoclorito de sódio na desinfestação foi significativo a 5% de probabilidade de erro para todas as variáveis, corroborando os resultados encontrados por Golle (2007) que encontrou diferenças significativas para desinfestação com hipoclorito de sódio em diferentes tempos.

A utilização de tempos elevados de imersão em hipoclorito de sódio pode ser eficiente na desinfestação das sementes, mas prejudiciais a germinação (GOLLE, 2007). Este fato pode ser observado na Figura 1 onde a porcentagem de germinação se manteve constante em aproximadamente 50%, para os tempos de 8h e 16 horas de imersão, por outro lado para o tempo de 24h ocorreu um decréscimo considerável na germinação. Este resultado pode ser explicado pela toxicidade ocasionada ao embrião das sementes inviabilizando a sua germinação. Sousa *et al.* (2007) concluíram que o hipoclorito de sódio foi bastante fitotóxico na desinfestação de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispata* principalmente em tempos de tratamento superiores a 18 horas.

Em contrapartida pode ser observado que a contaminação decresceu com o aumento de tempo de imersão, sugerindo que o maior tempo de ação do produto acarreta numa desinfestação mais profunda e eficiente de fungos e bactérias. 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 sugerida a hipótese de que o hipoclorito de sódio sob 12 horas e 47 minutos de imersão das sementes apresenta maior eficiência no controle de fungos, que não são tão importantes na germinação da *Brachiaria*.

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 decresceu com aumento do tempo de imersão das sementes em hipoclorito de sódio 2%. O nível de contaminação incidente sobre a semente está inversamente relacionado com a capacidade e velocidade de germinação (SOUSA *et al.*, 2007). 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 quanto maior a incidência de contaminação, menor será a porcentagem de sementes que germinará.

A porcentagem de sementes mortas e contaminadas também decresceu com o aumento do tempo de imersão das sementes no agente 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 assim como a fitotoxidez do agente desinfestante dificulta e até inviabiliza sua germinação, assim, um maior tempo de tratamento ocasionou uma menor taxa de germinação independente da maior eficiência de desinfestação. Pelo fato do aumento do tempo de exposição causar toxicidade nas sementes tornando-as inviáveis, pode ser constatado que o percentual de semente germinadas e contaminadas observada no gráfico é devido àquelas sementes que não sofreram efeito tóxico do agente hipoclorito de sódio no respectivo tempo de imersão.

Os resultados indicam que uma menor germinação não está apenas associada ao alto índice de contaminação das sementes, mas também a outros fatores como, fitotoxidez do agente utilizado e o tipo da contaminação. Segundo Montarroyos (2000) cada espécie e tecido a ser desinfestado

apresentam melhor afinidade por determinada metodologia no controle de microorganismos favorecendo de maneira direta a germinação em virtude da menor fitotoxidez do produto e melhor eficiência no controle principalmente de bactérias. 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 a contaminação por microorganismos bem como a fitotoxidade causada pelo elevado tempo de imersão no agente desinfestante. Desta forma, a utilização de hipoclorito de sódio 2% por um período de imersão de 12 horas e 47 minutos de sementes de *Brachiaria brizantha* proporcionou os melhores aproveitamentos na introdução de plantas para condições assépticas *in vitro* com a maior germinação neste tratamento (53,3%).

Conclusões

O tempo 24 horas de imersão com hipoclorito de sódio a 2% proporciona a menor porcentagem de contaminação nas sementes de *Brachiaria brizantha*.

A melhor porcentagem de germinação é obtida com 12 horas e 47 min de imersão em hipoclorito de sódio a 2%. Esta metodologia é recomendada para desinfestação de sementes de *Brachiaria brizantha* para introdução em cultivo *in vitro*, pois proporciona maior proporção de introdução de plantas viáveis na cultura de tecidos.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração do Assistente Sebastião Evaristo pelo auxílio na condução dos trabalhos e a FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- GOLLE, D.P. *Germinação in vitro de sementes de Pinnus taeda L. a partir de sementes selecionadas*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS. 2007, 97p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPq, v.1, 1998. p.183-260.
- 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.; OLIVEIRA, L.M.O. 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.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, n.1, p.405-407, 2007.

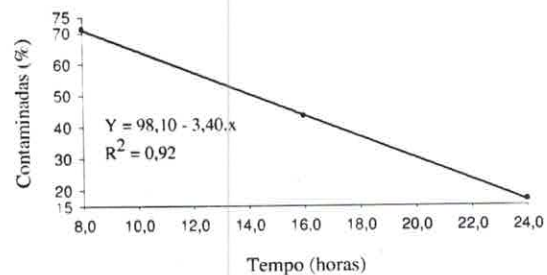
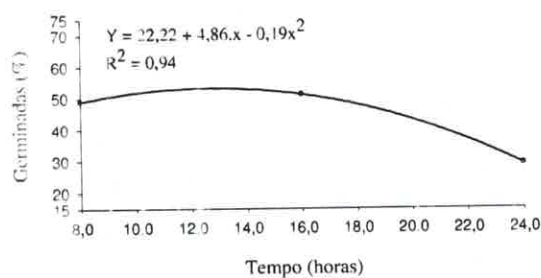


Figura 1. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2% sobre porcentagem de germinação e porcentagem contaminação de sementes de *B. brizantha*.

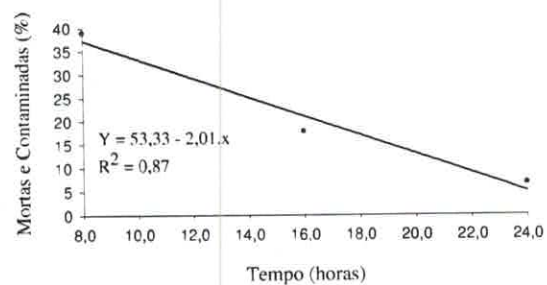
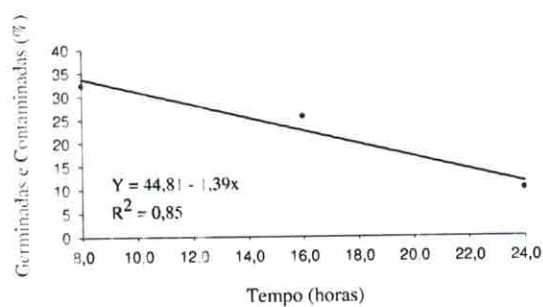


Figura 2. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2% sobre a porcentagem de sementes germinadas contaminadas e porcentagem de sementes mortas contaminadas de *B. brizantha*.

ANAIS do 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas



5º CBMP

10 a 13 de agosto de 2009

SESC - GUARAPARI-ES

*O melhoramento e os novos
cenários da agricultura.*

Documentos nº 011
ISSN 1518-4854