

EFICIÊNCIA DE AGENTES DESINFESTANTES DE SEMENTES DE *Brachiaria decumbens* PARA CULTIVO *in vitro*

Maurício Marini Köpp¹, Rafael Marques², Leônidas Paixão Passos¹, Maria Coletta Vidigal¹, Francisco José da Silva Léo¹, Naine Martins do Vale³, Leiri Daiane Barili³, Gislayne Aparecida Rodrigues Kelmer² e Fabio de Souza Fernandes²

Resumo

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 testar a eficiência de desinfestação de sementes de *Brachiaria decumbens* utilizando três agentes desinfestantes em dois tempos de imersão. Os tratamentos utilizados foram: solução de hipoclorito de sódio 2% por 18 e 24 horas, cloreto de benzalcônio 0,1% por 5 e 10 minutos e cloreto de mercúrio 1% por 2 e 10 minutos. As variáveis analisadas foram: contaminação, germinação e plantas introduzidas. De acordo com os resultados pode ser concluído que o cloreto de mercúrio foi extremamente tóxico para as sementes e os demais tratamentos não diferiram quanto à contaminação. O hipoclorito de sódio em imersão de 18 horas proporcionou a melhor germinação bem como a melhor porcentagem de introdução.

Introdução

A área cultivada com pastagem no Brasil duplicou nos últimos 20 anos, atingindo 100 milhões de hectares, onde aproximadamente 60 milhões de hectares são cultivados com *Brachiaria*. Em virtude dos ganhos genéticos cada vez menores e mais dispendiosos o uso de técnicas de biotecnologia vem 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, 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. Os agentes desinfestantes mais utilizados são etanol, hipoclorito de sódio ou de cálcio, ácido clorídrico, cloreto de mercúrio e cloreto de benzalcônio, porém cada espécie e tecido apresenta afinidade por determinado agente (MONTARROYOS, 2000), sendo necessário, então, testes para determinação da especificidade dos agentes para cada espécie (CARVALHO, 2006). Desse modo, o trabalho teve como objetivo verificar a eficiência dos agentes desinfestantes: hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio e cloreto de benzalcônio, em sementes de *B. decumbens*, em dois tempos de imersão para cada um destes agentes.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas sementes *B. decumbens* cv. Basilisk, as quais foram lavadas em água corrente e posteriormente com água destilada por três vezes. Após as lavagens, as sementes foram imersas em álcool 70% durante 30 minutos. Em seguida foram separadas em seis amostras iguais as quais foram submetidas à desinfestação com as soluções de: hipoclorito de sódio 2%, pelos períodos de 18 e 24 horas de imersão, cloreto de mercúrio 1% por 2 e 10 minutos e cloreto de benzalcônio 0,1%

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.

por 5 e 20 minutos. Após a desinfestação as soluções foram drenadas e as sementes lavadas três vezes, 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 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 de germinação e incidência de contaminação, as quais geraram as variáveis: *i*) germinadas, *ii*) contaminadas e *iii*) plantas introduzidas. Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando os fatores fixos e a seguir, os efeitos dos agentes foram testados através de teste de comparação de médias por de Tukey a 5% de significância sendo apresentados na forma de gráficos individuais para cada variável.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados obtidos do experimento pode ser verificado que o tratamento com cloreto de mercúrio proporcionou 100% de desinfestação das sementes, porém o mesmo se demonstrou extremamente fitotóxico para as sementes inviabilizando 100% da germinação das amostras. Patra e Sharma (2000) em experimento relataram que o mercúrio age diretamente no embrião da semente ou no endosperma, interferindo nas pontes -SH e formando -S-Hg-S-. Essa alteração pode afetar o crescimento do embrião, uma vez que esses tecidos são ricos em pontes -SH. Dessa forma os dados obtidos desse agente desinfestante não foram utilizados para as análises.

De acordo com os resultados das análises de variância (dados não apresentados), pode ser constatado que houve efeito significativo da fonte de variação “tempo de imersão” para as variáveis germinação e a quantidade de plantas introduzidas apenas no experimento realizado com hipoclorito de sódio. Os resultados da análise conjunta de experimentos evidenciam que a germinação e a quantidade de plantas introduzidas se comportaram de forma diferenciada frente a variação de “tempo de imersão” para cada agente desinfestante (Figuras 2 e 3).

Na Figura 1 pode ser verificado que para a variável contaminação não houve diferenças significativas entre os agentes, hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio em ambos os tempos de imersão das sementes, porém se observa que para todos os tratamentos a porcentagem de contaminação atingiu valores elevados, mostrando que os agentes desinfestantes não eliminaram totalmente os microorganismos. Sousa *et al.* (2007) concluíram que o agente desinfestante cloreto de benzalcônio na concentração de 0,1% proporcionou os melhores resultados no combate aos microorganismos contaminantes do meio de cultivo de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. Estes resultados evidenciam de maneira mais clara a especificidade de cada espécie por determinado agente desinfestante. De acordo com os resultados pode ser constatado que a todos os agentes desinfestantes testados obtiveram o mesmo desempenho no combate aos microorganismos infectantes das sementes de *B. decumbens*.

Na Figura 2 pode ser observado que as sementes tratadas com hipoclorito de sódio apresentaram valores elevados de germinação no tempo de imersão de 18 horas mostrando que este tratamento foi estatisticamente diferente dos demais, sendo que o desinfestante cloreto de benzalcônio de alguma forma contribuiu para a diminuição do potencial de germinação das sementes assim como o hipoclorito de sódio sob 24 horas de imersão. 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. Associando este resultado com os obtidos por Sousa *et al.* (2007) que concluíram que o cloreto de benzalcônio é mais eficiente que outros agentes no controle de fungos, pode ser concluído que o tratamento com cloreto de benzalcônio possivelmente controlou mais acentuadamente a contaminação por fungos e não é tão importante na germinação da sementes.

Quando se deseja avaliar a eficiência de agentes desinfestantes as duas variáveis estudadas anteriormente são de extrema importância, visto que elas podem mensurar qual o agente desinfestante proporciona melhor eficiência na eliminação de patógenos, bem como a melhor germinação. No cultivo *in vitro* o objetivo final é ter o máximo de explantes viáveis, para que estes possam continuar seu desenvolvimento. Na Figura 3 pode ser visualizado os resultados referentes a porcentagem de

introdução efetiva de plantas no cultivo *in vitro*. Verifica-se que o agente hipoclorito de sódio foi o que proporcionou a melhor porcentagem de introdução, quando as sementes foram imersas por um período de 18 horas.

Avaliando as figuras conjuntamente, pode ser constatado que o agente desinfestante cloreto de benzalcônio proporciona uma desinfestação eficiente, no entanto sua toxidez diminui a porcentagem de germinação das sementes, não sendo este um bom agente visto que ambas as variáveis devem estar correlacionadas para que a eficiência na introdução de explantes seja máxima. Desta forma para se ter uma satisfatória porcentagem de plantas introduzidas em meio de cultivo oriundas de sementes de *B. decumbens* deve ser utilizado o agente desinfestante hipoclorito de sódio com imersão das sementes por um período de 18 horas. Os resultados indicam que uma menor germinação não está diretamente associada ao alto índice de contaminação das sementes, mas também a outros fatores como tipo de contaminação. Segundo Montarroyos (2000) cada agente desinfestante apresenta melhor eficiência no controle de determinados microorganismos favorecendo de maneira direta a germinação em virtude da menor fitotoxidez do produto e melhor eficiência no controle de bactérias.

Conclusões

O cloreto de mercúrio 1% é extremamente tóxico as sementes de *Brachiaria decumbens* nos tempos de 2 e 10 minutos inviabilizando totalmente a germinação e sua utilização como agente desinfestante nestas condições.

Os agentes hipoclorito de sódio 2% sob imersão de 18 e 24 horas e cloreto de benzalcônio 0,1% sob imersão de 5 e 10 minutos não diferem estatisticamente quanto a eficiência de desinfestação de sementes de *Brachiaria decumbens*. O hipoclorito de sódio com tempo de imersão de 18 horas é o produto que proporcionou a melhor germinação de sementes.

Para a variável, plantas introduzidas o melhor tratamento é o hipoclorito de sódio 2%, com 18 horas de imersão das sementes, sendo este tratamento recomendado para maximizar a porcentagem de plantas introduzidas em meio de cultivo asséptico.

Agradecimentos

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

Referências

- CARVALHO, J.M.F.C. *Curso de Cultivos de Tecidos Vegetais*. Documentos 157. Campina Grande: Embrapa, 2006, 20p.
- 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.
- PATRA, M.; SHARMA, A. Mercury toxicity in plants. *Botanical Review*. v.66, n.3, 379-422, 2000.
- 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 crispata*. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, n.1, p.405-407, 2007.

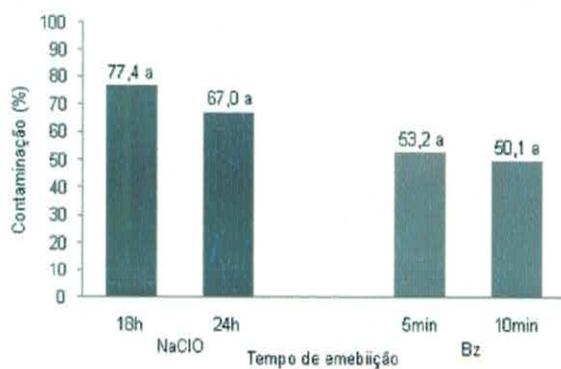


Figura 1. Porcentagem de contaminação de sementes de *B. decumbens*, submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de benzalcônio (Bz) em dois tempos de imersão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P > 0,05$).

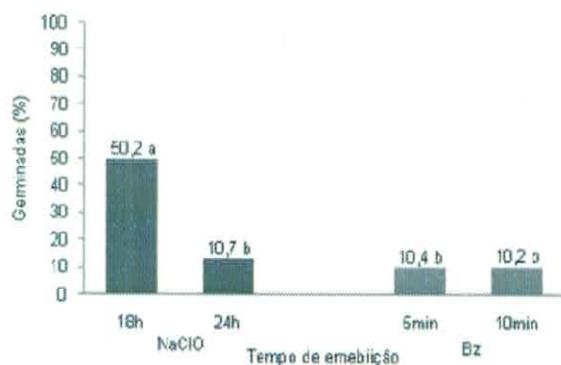


Figura 2. Porcentagem de germinação de sementes de *B. decumbens*, submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de benzalcônio (Bz) em dois tempos de imersão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P > 0,05$).

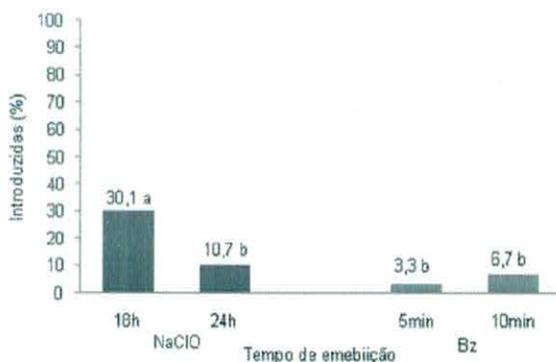


Figura 3. Porcentagem de introdução de sementes se *B. decumbens*, submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de benzalcônio (Bz) em dois tempos de imersão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P > 0,05$).

ANAIS do 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas



5º CBMP

10 a 13 de agosto de 2009
SESC - GUARAPARI-ES

© melhoramento e os novos
cenários da agricultura.

Documentos nº 011
ISSN 1518-4854