



UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO PERACÉTICO NA DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DE *PENNISETUM PURPUREUM* SCHUM. PARA CULTIVO *IN VITRO*

Cássia Rossany Gomes dos Reis¹, Rafael Marques², Raquel Bezerra Chiavegatto¹, Cintia Oliveira Silva¹, Fernanda Vidal de Campos¹, Audrey Moraes da Costa², Leônidas Paixão Passos³, Mauricio Marini Köpp³

1- Estudante de Ciências Biológicas, Estagiário da Embrapa Gado de Leite, cassiarossany@yahoo.com.br;
2- Estudante de Química, Estagiário da Embrapa Gado de Leite.; 3- Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

Palavras-chave: desinfestação, cultura de tecidos, ácido peracético, capim-elefante.

INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma forrageira tropical que apresenta elevado potencial de produção de biomassa e fácil adaptação aos diversos ecossistemas, sendo muito utilizado na alimentação de rebanhos bovinos leiteiros sob as formas de pastejo, feno e silagem.

A qualidade do propágulo utilizado é um fator que tem merecido pequena atenção, mas que pode contribuir para o sucesso ou não do cultivo dessa espécie forrageira. O capim-elefante é propagado predominantemente de forma assexuada. Sabe-se que nesses casos, embora a constituição genética seja mantida, o propágulo tem sua qualidade fitossanitária depauperada devido às sucessivas contaminações por patógenos. Nesse sentido, a técnica de cultura de tecidos tem apresentado resultados surpreendentes na restauração da produtividade de importantes culturas, como a cana-de-açúcar, mandioca e outras (KARASAWA, 2001).

A propagação *in vitro* de plantas, chamada também de micropropagação, é uma técnica para produção de plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro, sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂. Através da cultura de meristemas, podem-se fazer trabalhos de criopreservação para conservar materiais em bancos de germoplasmas, com economia de espaço e dinheiro, especialmente em espécies de reprodução assexuada. Com a cultura de meristemas apicais, pode-se pensar em obter plantas livres de vírus, e com a cultura de gemas axilares, propagar milhares de plantas, com genótipos superiores, por exemplo, resistentes a patógenos. No campo da aplicação básica, a cultura de tecidos dá suporte técnico à várias ciências, entre elas a fisiologia vegetal, em estudos de crescimento e desenvolvimento, efeito de metais pesados, etc. (CID, 2001).

Um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação. Essa pode apresentar-se de forma superficial ou endógena e, de origem bacteriana ou fúngica. Tal problema estabelece-se no meio de cultura e/ou material vegetal competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento do explante, ocasionando, assim, sua perda (SOUSA *et al.*, 2007).

Dentre as etapas da micropropagação, a desinfestação têm apresentado baixa eficiência, pois deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar e inviabilizar o mesmo. A concentração da solução, a combinação dos princípios ativos e o tempo de exposição podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), fazendo-se necessária, portanto, a definição de um protocolo eficiente de desinfestação de acordo com a espécie e com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (FLÔRES, 2007).

Existem diversas substâncias que podem ser utilizadas para a assepsia do material vegetal, dentre estas se podem citar os antibióticos, álcoois (etanol), halogênicos (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio), sais de metais pesados (cloreto de mercúrio) e fungicidas orgânicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; CID, 2001). Os agentes desinfestantes podem ser



utilizados de maneira associada ou não, para uma maior eficiência do protocolo de desinfestação (FLÔRES, 2007). O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é outro agente sanitizante que tem sido utilizado, porém com poucas referências a respeito. Sua eficiência é semelhante ou superior a do hipoclorito de sódio, porém mais potente que o peróxido de hidrogênio (NASCIMENTO, 2002 *apud* SREBERNICH, 2007). Trata-se de um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos microrganismos.

MARANA *et al.* (2009), afirmam que o hipoclorito de sódio promove a descontaminação na superfície dos explantes, mas não controla a contaminação endofítica, dessa maneira propõem a utilização de um tratamento complementar com ácido peracético. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do ácido peracético na desinfestação de explantes de capim-elefante, a fim de elaborar um protocolo de desinfestação para sua introdução em cultivo *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal pertencente à Embrapa Gado de Leite, na cidade de Juiz de Fora, MG.

Foram utilizados explantes (meristemas axilares) de plantas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE) cultivar Cameroon-Piracicaba da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG. Na desinfestação os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) por 5 minutos, e em seguida foram submetidas à desinfestação com a solução de ácido peracético na concentração de 4,0% e 6,0%, por períodos de 30 e 40 minutos. Após transcorrido estes tempos, as soluções foram drenadas e os explantes lavados por três vezes consecutivas, com água destilada esterilizada em autoclave em capela de fluxo laminar asséptica. Para a indução de brotações foi utilizado o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo 0,6% de ágar, 3% de sacarose e suplementado com 2 μ mol 6-benzilaminopurina (BAP) e 1 μ mol ácido naftalenoacético (ANA) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições 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).

O experimento foi avaliado 30 dias após a introdução, as variáveis mensuradas foram: i) número de explantes contaminados vivos; ii) número de explantes contaminados mortos; iii) número de explantes não contaminados vivos e iv) número de explantes não contaminados mortos. E associando duas a duas as variáveis mensuradas, foram estimadas as variáveis: v) total de explantes contaminados; vi) total de explantes não contaminados; vii) total de explantes vivos e viii) total de explantes mortos.

Os resultados foram submetidos a análise de variância em um modelo de blocos ao acaso em esquema fatorial considerando-se os efeitos dos fatores de tratamentos como fixos e a seguir teste de comparação de médias de Skott Knott a 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software SAS (SAS, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância revelaram haver efeito de interação significativo para todas as variáveis exceto número de contaminadas mortas (NCoM) e total de vivas (TV) (Tabela 1). Estes resultados permitem concluir que as alterações de um tempo de tratamento ou de uma concentração da solução de tratamento dependem um do outro. As variáveis número de contaminadas e mortas (NCoM) e total de vivas (TV) apesar de não terem apresentado efeito de interação significativo, apresentaram efeitos isolados dos fatores tempo e concentração, indicando assim, que também alteram seus valores quando modificados os tempos ou as concentrações dos tratamentos.



Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis contaminadas vivas (CoV), contaminadas mortas (CoM), não contaminadas vivas (NCov), não contaminadas mortas (NCoM), total de contaminadas (TCO), total de não contaminadas (TNCO), total de vivas (TV) e total de mortas (TM) em explantes de capim-elefante tratados com ácido peracético para introdução *in vitro*.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio							
		CoV	CoM	NCoM	NCov	TCO	TNCo	TV	TM
Concentração	1	1683,26*	10,69*	302,41*	406,95*	1425,70*	1410,97*	434,92*	426,80*
Tempo	1	13,51 ^{ns}	21,68*	106,40*	5,10 ^{ns}	69,43 ^{ns}	64,91*	35,22*	32,02*
Interação	1	773,89*	13,73*	0,39 ^{ns}	676,87*	581,47*	709,70*	3,25 ^{ns}	18,74*
Resíduo	4	1,66	0,040	1,12	43,00	1,22	31,07	47,59	1,24
Média		32,62	3,36	11,96	52,17	35,97	64,13	84,79	15,31
C.V.		3,95	5,94	8,87	12,57	3,08	8,69	8,14	7,28

G.L. = Graus de liberdade; C.V. = Coeficiente de variação; * = Significativo pelo teste F ($p \leq 5\%$); ^{ns} = Não significativo.

A análise prosseguiu de modo a verificar as diferenças existentes entre os tratamentos nas variáveis de maior interesse para a introdução de explantes de capim-elefante *in vitro*. A comparação dos efeitos dos tratamentos com relação as variáveis taxa de introdução e taxa de mortalidade podem ser visualizadas na Figura 1. De acordo com o resultado do teste de Skott Knott fica claramente evidenciado que não houve diferenças significativas entre os tratamentos para a variável taxa de sobrevivência, contrariando os resultados da análise de variância (teste F) o que pode ser explicado pela inclusão de diferentes parâmetros estatísticos nas duas análises. Os resultados demonstram que para qualquer tratamento utilizado a taxa de sobrevivência é constante e de valor elevado (média = 84,79%).

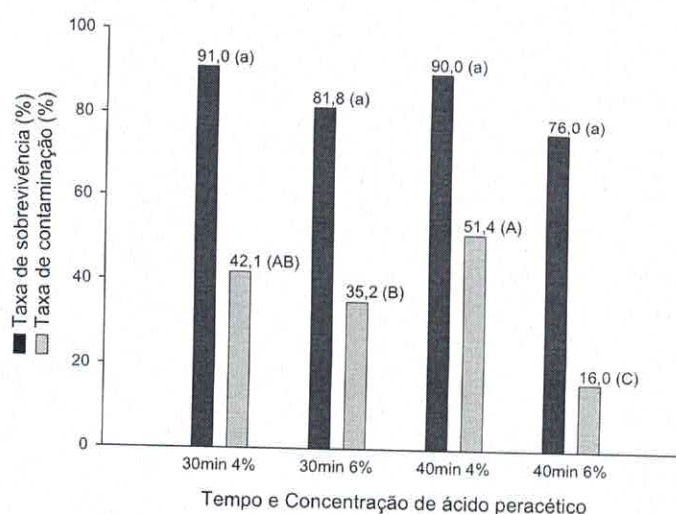


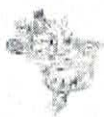
Figura 1. Taxa de sobrevivência e de contaminação de explantes de capim-elefante submetidos a quatro tratamentos de desinfestação com ácido peracético para introdução *in vitro*.

Quando a taxa de contaminação é analisada fica evidente que o efeito da concentração do produto é bem mais marcante no tempo de 40 minutos com uma redução de 68% no número de explantes contaminados. Já para o tempo de 30 minutos não houve diferença estatística no número de explantes contaminados quando a concentração é aumentada de 4 para 6%. Conclui-se desta maneira que o tratamento que apresentou menor taxa de contaminação foi 6% de ácido peracético sob 40 minutos de imersão. SREBERNICH (2007) em seu trabalho com cheiro-verde minimamente processado, concluiu que o efeito do tempo de contato do ácido peracético foi menos marcante que



SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R. Contaminação microbiana na propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(1): 405-407, 2007.

SREBERNICH, S.M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(4): 744-750, 2007.



o efeito da concentração. Já nos resultados obtidos neste trabalho fica claro que o efeito da concentração foi mais marcante apenas quando considerado dentro do tempo de 40 minutos.

MARANA *et al.* (2009) em seus experimentos demonstraram que o tratamento dos ápices caulinares de plantas de *Jacaratia spinosa* com a solução de Saniagri® (ácido peracético 2%) 33% v/v, durante 15 minutos, mais a pulverização de solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) 1% v/v resultou em uma porcentagem de descontaminação entre 60% e 80%.

Ao observar a taxa de introdução efetiva (Figura 2), percebe-se uma diminuição dos valores comparados à taxa de sobrevivência visualizada na Figura 1, indicando que nem todos os explantes que sobreviveram ao efeito do ácido peracético foram realmente introduzidos, ou seja, alguns explantes apesar de vivos apresentaram contaminação diminuindo a taxa de introdução efetiva. Da mesma maneira como ocorreu com a variável taxa de contaminação, fica evidente que o efeito da concentração é bem mais acentuado dentro do tempo de 40 minutos, onde percebe-se um acréscimo de 25,4% de explantes introduzidos quando aumentada a concentração de 4 para 6%. KÖPP *et al.* (2009a), em seu trabalho com sementes de *Brachiaria decumbens*, verificou 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. Diante dos resultados encontrados, pode-se inferir que o ácido peracético é um agente desinfestante que deve apresentar baixa toxicidade à planta.

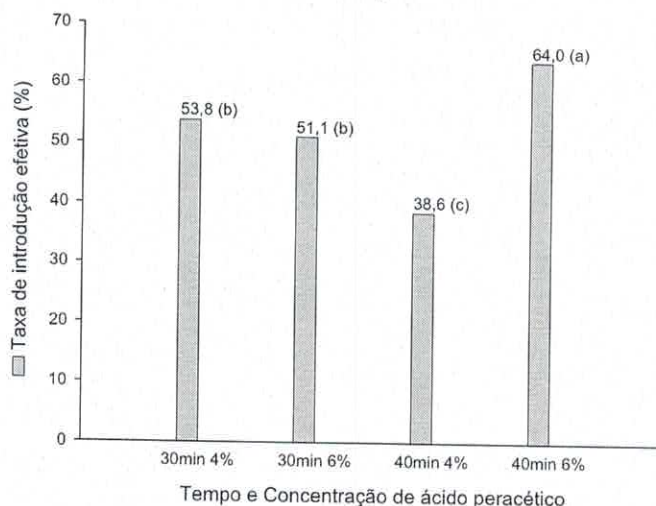


Figura 2. Taxa de introdução efetiva de explantes de capim-elefante submetidos a quatro tratamentos de desinfestação com ácido peracético para introdução *in vitro*.

Assim como demonstrado na Figura 2, a taxa de introdução efetiva dos explantes imersos durante 30 minutos não revela diferenças significativas quando alterada a concentração do agente em estudo. Por outro lado, quando se mantém as concentrações e modifica-se o tempo de imersão, os resultados mostram-se inversos. Ao aumentar o tempo de imersão para 40 minutos, a taxa de introdução cai na concentração 4% e eleva na concentração 6%. Ou seja, sob a concentração de 6% é extremamente vantajoso aumentar o tempo de imersão, possivelmente em função de diminuir a contaminação sem causar morte de explantes. Já sob a concentração de 4% o aumento no tempo de imersão causa diminuição no número de explantes introduzidos *in vitro*, possivelmente em decorrência de aumento da mortalidade de explantes.

KÖPP *et al.* (2009b) trabalhando com sementes de *B. brizantha* cv. Marandu observou que concentrações elevadas de hipoclorito de sódio para desinfestação para germinação *in vitro* proporcionaram um aumento na porcentagem de germinação das sementes. Estes autores também



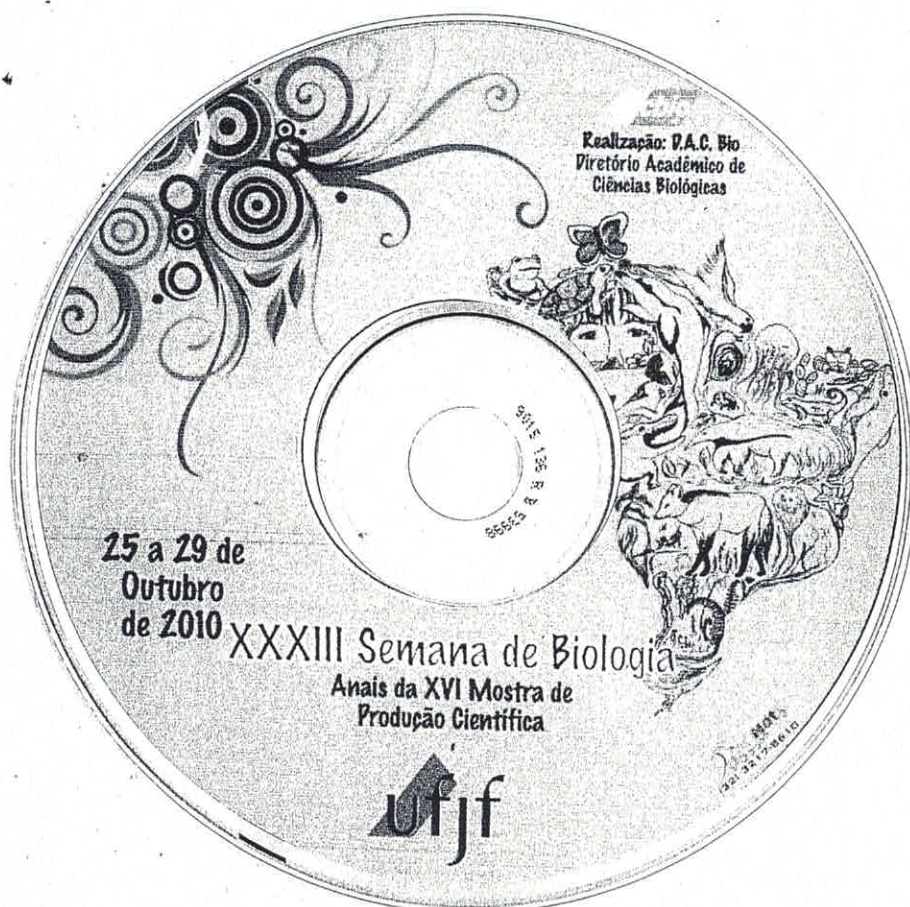
concluíram que o aumento da concentração do agente desinfestante que reduz a incidência de contaminação é responsável entre outros fatores pela diminuição do potencial germinativo das sementes. Os resultados encontrados por KÖPP *et al.* (2009) corroboram com os apresentados nesse trabalho pois quando analisados os resultados de cada tratamento isoladamente (Figura 2), o tratamento de 40 minutos de imersão e concentração de 6% é o que demonstra melhor taxa de introdução efetiva (64%). Desta forma, pode-se concluir que a desinfestação de explantes de *Pennisetum purpureum* por ácido peracético a 6% e sob tempo de tratamento de 40 minutos se mostrou eficaz.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta no estudo da biologia moderna de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Ano 3, n.19 - mar/abr, 2001. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/>. Acesso em: ago. de 2010.
- FLÔRES, A.V. Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2007. 75p.
- 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.
- KARASAWA, M.M.G. Revigoração de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas à termoterapia e cultura de tecidos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2001. 135p.
- KOPP, M.M.; PASSOS, L.P.; VIDIGAL, M.C.; LÉDO, F.J.S.; VALE, N.M.; BARILI, L.D.; KELMER, G.A.R.; FERNANDES, F.S. Eficiência de agentes desinfestantes de sementes de *Brachiaria decumbens* para cultivo *in vitro*. In: **5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, 2009, Guarapari - ES. *Anais...* Vitória - ES: Incaper, 2009.
- KOPP, M.M.; BARILI, L.D.; VALE, N.M.; KELMER, G.A.R.; FILGUEIRAS, A.L.; VIDIGAL, M. C.; PASSOS, L. P. Efeito da concentração de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de *Brachiaria brizantha* para cultivo *in vitro*. In: **46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2009, Maringá - PR. *Anais...* Maringá - PR: Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- MARANA, J. P.; MIGLIORANZA, E.; FARIA, R. T. de. Estabelecimento *in vitro* de *Jacaratia spinosa* (Aubl.) ADC. **Semina: Ciências Agrárias**, 30 (2): 271-274, 2009.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, 36/37, 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.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System - Getting Started with the SAS® Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute. 2002. 86p.



Realização: V.A.C. Bio
Diretório Acadêmico de
Ciências Biológicas

25 a 29 de
Outubro
de 2010

XXXIII Semana de Biologia

Anais da XVI Mostra de
Produção Científica

ufjf

Met
30 3417 0610