

**DOSES DE HIPOCLORITO E TEMPOS DE CONTATO NO ESTABELECIMENTO
in vitro DE SEMENTES DE ROSA DO DESERTO, (*Adenium obesum* Roem. &
Schult. (Forssk.))**

Yahn Ricardo Ribeiro Marchi¹
Dayane Àvila Fernandes²

RESUMO:

A espécie *Adenium sp* conhecida popularmente como rosa-do-deserto, é uma suculenta de aspecto escultural, caracterizada por sua ramagem espessa e base caular dilatada. Sua utilização é no paisagismo. A propagação de mudas pelo método de micropropagação *in vitro* tem como principal vantagem produção de maiores números de mudas com alta qualidade genética. Objetivou-se neste trabalho avaliar doses de hipoclorito e tempo de contato na assepsia de sementes de rosa do deserto. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Universitário de Várzea Grande – UNIVAG no período de agosto a novembro de 2017. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial (2x4) +1, considerando dois tempo de contato com hipoclorito (15 e 20 minutos) e cinco doses de hipoclorito (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%), constituindo de 9 tratamentos com três repetições. Aos 7 dias após a inoculação foram avaliadas as variáveis: germinação (%); número de sementes contaminadas por bactérias e fungos, e número de sementes sadias. O tratamento com hipoclorito de sódio com maior eficiência foi em T9 com 20 minutos de imersão em 2,0% de cloro ativo, observando 0% de contaminação, e a testemunha com 77% de contaminação. A utilização de 2,0% de hipoclorito por 20 minutos é eficiente na assepsia de sementes de *Adenium sp*.

Palavras-chave: assepsia, cloro ativo, bactericida.

ABSTRACT:

The species *Adenium sp* popularly known as desert rose, are juicy sculptural aspect, characterized by its thick tuft and dilated root base. Its use is in landscaping. The propagation of seedlings by the micropropagation method *in vitro* has as its main advantage the production of higher numbers of seedlings with high genetic quality. The aim of this work is to evaluate doses of hypochlorite and contact times in the on seeds asepsis of rose seeds from the desert. The experiment was conducted on the Biotechnology University Centre Laboratory of Várzea Grande – UNIVAG from August to November 2017. The experimental design was completely randomized (DIC), factorial scheme (2x4)+1, considering two contact times with hypochlorite (15 and 20 minutes) and five doses of hypochlorite (0, 0; 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0%), consisting of 9 treatments with three repetitions. At 7 days after the inoculation the following variables were evaluated: germination (%); number of seeds contaminated by bacteria and fungi and the number of healthy seeds. The treatment with sodium hypochlorite with higher efficiency was in T9 with 20 minutes of immersion in 2,0% of active chlorine, absorbing 0% of contamination, and the witness with 77% of contamination. The utilization of 2,0% of hypochloride for 20 minutes is efficient on the seeds asepsis from te *Adenium sp*. Key Words: asepsis, active chloride, bactericidal.

Key Words: asepsis, active chloride, bactericidal.

¹ Graduando em Agronomia pela Univag – Centro Universitário de Várzea Grande-MT

² Docente do Curso de Agronomia do UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande-MT, Doutora em Agricultura Tropical.

1 INTRODUÇÃO

A *Adenium sp.*, pertence à família das Apocináceas, conhecida popularmente como rosa-do-deserto é nativa de regiões áridas, e foi introduzida no Brasil há pouco tempo. É uma planta herbácea tipicamente suculenta, que consegue sobreviver a extremas situações de escassez de água, amplitude térmicas e umidade relativa. Pode alcançar de 1 a 3 metros de altura se deixada crescer livremente, com folhas em espiral agrupadas nas pontas dos ramos, tem caule e raízes entumecidos com finalidade de armazenar água (TALUKDAR, 2012).

Existe duas formas de propagação de mudas da rosa do deserto, sendo a mais difícil via semente e, a mais fácil por estaca. Um dos problemas encontrados no método via semente é a baixa produção acarretada por problemas de polinização e parte reprodutiva estéril. O método mais utilizado e mais fácil não é aprovado pelos consumidores, visto que não apresenta mesma beleza que a produção via semente (VARELLA et al., 2010).

A propagação de mudas pelo método de micropropagação “in vitro” tem crescido nos últimos tempos, tendo como algumas vantagens produção de maiores números de mudas com alta qualidade genética, sendo possível a produção em qualquer época do ano, e também a produção de espécies que dificilmente seriam propagadas pelo método convencional (FRAGUAS et al., 2006).

A prática de micropropagação “in vitro” oferece algumas dificuldades, sendo uma delas a assepsia dos explantes oriundos do campo. Patógenos como bactérias, fungos e vírus podem contaminar o explante tanto internamente como externamente, comprometendo assim o cultivo em laboratório. Quando a contaminação é exógena a assepsia é mais fácil e, quando endógena, o processo de descontaminação é mais difícil, podendo haver perdas de tempo, recursos financeiros e material genético (BARRUETO, 2006).

A descontaminação vem sendo uma das etapas do processo de micropropagação mais importante, não só o explante como também os materiais e ambiente usados na inoculação dentro da câmara de fluxo laminar (BARRUETO, 2006). As espécies lenhosas possuem dificuldades de estabelecimento *in vitro*, pois muitos explantes são oriundo do campo, apresentando contaminação interna ou externa por microrganismos (COUTO et al., 2004). O uso de substâncias com ação germicida é bastante utilizado e muito eficiente no processo de assepsia, sendo o hipoclorito de sódio o mais usado em várias concentrações de cloro ativo (PEREIRA et al., 2011), pode ser utilizado também o álcool 70%, que por ser surfactante facilita ação de outros produtos (SOUSA et al., 2008). Altas concentrações de hipoclorito e tempo elevado de imersão pode inviabilizar o tecido vegetal, acarretando em perdas (COUTO

et al., 2004).

A partir do exposto objetivou-se testar doses de hipoclorito e tempo de contato na assepsia de sementes de rosa do deserto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia no Univag Centro Universitário, localizado no município de Várzea Grande, MT, no período de fevereiro a junho de 2017.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x4) +1 (testemunha), considerando cinco doses de hipoclorito de sódio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e dois tempo de contato com a solução (15 e 20 minutos), constituindo de nove tratamentos com três repetições cada (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos com as respectivas doses e tempo de contato com hipoclorito de sódio na assepsia de sementes de rosa do deserto.

| Tratamentos | Doses (%) | Tempo (min) |
|-------------|-----------|-------------|
| T1 | 0 | - |
| T2 | 0,5 | 15 |
| T3 | 1,0 | 15 |
| T4 | 1,5 | 15 |
| T5 | 2,0 | 15 |
| T6 | 0,5 | 20 |
| T7 | 1,0 | 20 |
| T8 | 1,5 | 20 |
| T9 | 2,0 | 20 |

As sementes de rosa do deserto (*Adenium sp.*) foram compradas em um viveiro comercial em Cuiabá, MT.

Os recipientes utilizados para inocular as sementes foram frascos cilíndricos de vidro com capacidade de 250 ml, diâmetro externo de 68 mm e altura de 100 mm. Em cada frasco foi adicionado 20 ml de meio de cultura MS, formulado por Murashige e Skoog (1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 3 ml L⁻¹ de BAP, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] e pH ajustado em 5,8 ±0,2. Após o preparo, os frascos foram levados para a esterilização em autoclave, em temperatura de 120°C e 1 kgf cm⁻² de pressão, por 20 minutos. Na sequência foram retirados da autoclave, armazenados em estante na sala de repicagem

para resfriar em temperatura ambiente e solidificar o meio de cultura.

Estas sementes foram lavadas com detergente Tween 20[®] (3 ml L⁻¹) diluído em água destilada, mexendo por três minutos e enxaguadas três vezes com água destilada. Na sequência foram adicionados 20 mL de álcool 70% (v/v) em cada frasco com as sementes e foram agitadas por um minuto, seguido por três enxágues em água destilada. Em seguida, as sementes foram embebidas pelos tempos estabelecidos no experimento (15 e 20 minutos), em soluções contendo as doses de hipoclorito de sódio 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (v/v), com subsequentes três enxágues em água destilada e autoclavada.

Para finalizar a assepsia foram então colocadas em sacos plásticos (15x27cm) contendo 0,5 ml do fungicida Vitavax-thiram[®] (1% m/v carboxina + 1% m/v tiram) e homogeneizadas por fricção até a cobertura total das sementes pelo produto. A determinação da dose foi feita de acordo com a quantidade adequada para cobertura das sementes e não foi realizado mais nenhum enxágue.

Após a desinfestação, as sementes foram então inoculadas nos frascos contendo meio de cultura previamente preparado em câmara de fluxo laminar previamente homogeneizada com álcool 70% e as pinças utilizadas para colocar as sementes em contato com o meio de cultura dentro dos frascos foram esterilizadas em autoclave. Para cada frasco inoculado, as pinças passaram por flambagem com álcool 95% e foram utilizadas frias para evitar injúrias ao tecido vegetal. Foram três frascos por tratamento contendo três sementes em cada.

A avaliação foram semanais, iniciando aos 7 dias após a inoculação das sementes no meio de cultura até completar 28 dias através de análise visual, totalizando em quatro avaliações. As variáveis avaliadas foram: germinação (%); número de sementes contaminadas por bactérias e fungos, e número de sementes sadias.

Os dados não obedeceram as pressuposições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados, sendo assim foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal – Wallis, agrupando os tratamentos que não diferiram entre si, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa para germinação e contaminação por bactérias nos resultados obtidos. Já para as variáveis contaminação por fungos e sementes sadias resultaram em diferenças significativas para as avaliações realizadas até os 28 dias após o início do trabalho (Tabela 2).

Tabela 2. Contaminação por fungos e sementes sadias de rosa do deserto, submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de contato.

| TRATAMENTOS | Contaminação por fungos | | | |
|-------------|-------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Av1 ¹ | Av2 ² | Av3 ³ | Av4 ⁴ |
| T1 | 2,0a | 2ab | 2,3ab | 2,3abc |
| T2 | 0,3b | 0,3c | 0,3c | 2,3ab |
| T3 | 0,3b | 0,3c | 0,6c | 0,6cd |
| T4 | 0,6b | 0,6c | 1,0bc | 1,3bcd |
| T5 | 3,0a | 3,0a | 3,0a | 3,0a |
| T6 | 0,3b | 0,6bc | 1bc | 1,6abcd |
| T7 | 0,3b | 0,3c | 1bc | 3,0a |
| T8 | 0b | 0c | 0c | 3,0a |
| T9 | 0b | 0c | 0c | 0d |

| | Sementes sadias | | | |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Av1 ¹ | Av2 ² | Av3 ³ | Av4 ⁴ |
| T1 | 1,0b | 1bc | 0,6bc | 0,6bcd |
| T2 | 2,6a | 2,6a | 2,6a | 0,6cd |
| T3 | 2,6a | 2,6a | 2,3a | 2,3ab |
| T4 | 2,3a | 2,3a | 2ab | 1,6abc |
| T5 | 0b | 0c | 0c | 0d |
| T6 | 2,6a | 2,3ab | 2ab | 1,3abcd |
| T7 | 2,6a | 2,6a | 2ab | 0d |
| T8 | 3,0a | 3,0a | 3,0a | 0d |
| T9 | 3,0a | 3,0a | 3,0a | 3,0a |

¹ Av1: Primeira avaliação com 7 dias; ² Av2: Segunda avaliação com 14 dias; ³ Av3: Terceira avaliação com 21 dias; ⁴ Av4: Quarta avaliação com 28 dias; Valores na linha seguidos de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Verificou-se que o tratamento com hipoclorito de sódio com maior eficiência foi em T9 com 20 minutos de imersão em 2,0% de cloro ativo, observando 0% de contaminação (Tabela 2). O tratamento T1 (testemunha) com 77% de contaminação indica que sem o uso de cloro ativo dificulta a continuidade do processo de micropropagação.

Observou-se que a contaminação por fungos foi aumentando conforme o tempo, a cada avaliação os níveis aumentavam gradativamente, principalmente nos tratamentos com 20 minutos de imersão no hipoclorito de sódio, todos explantes empregados apresentaram maiores porcentagens de contaminação, com exceção do T9. Segundo Ferreira et al. (2009), em alguns casos a contaminação por fungos e bactérias só vem aparecer após alguns dias de inoculação.

A desinfestação da semente é uma das etapas mais críticas do processo de micropropagação, visto que a contaminação pode ser endógena ou exógena, sendo a mais comum exógena, quando fungos e bactérias se hospedam no tegumento da semente e se

desenvolverem no momento do estabelecimento em meio de cultura (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

Dentre as substâncias com ação germicida, as mais utilizadas para a desinfestação superficial dos explantes são hipoclorito de sódio e o álcool 70% em diferentes concentrações e tempo de imersão (Pereira et al., 2009). Além da ação germicida, o etanol facilita a ação de outros produtos devido sua ação surfactante quando utilizado em concentrações de 70 a 80% (Sousa et al., 2008). Nietzsche et al. (2006), afirmam que dependendo do tempo de imersão pode ocorrer desidratação do explante, comprometendo assim a viabilidade do tecido vegetal. Sendo assim, acredita-se que o fato de não haver germinação e contaminação por bactéria e fungos no T9, pode ser relacionado ao tempo de imersão ou concentração de produto.

Rego et al. (2012), testando a desinfestação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (conhecida popularmente como Maria-preta) com álcool 70%, seguido de NaClO a 1%, ambos por 30s, seguido de lavagem em água destilada e esterilizada, verificou maior eficiência na assepsia das sementes.

Apesar de não ter sido feita a identificação dos fungos, provavelmente deveriam ser de espécies diferentes, o que explica o fato do fungicida Vitavax-thiram® não ter controlado a contaminação 100%. De acordo com Paul et al. (2001), a utilização de fungicidas para descontaminação superficial de explantes é bastante comum, essa pratica tem apresentados efeitos positivos na multiplicação de plantas cultivadas *in vitro*. Em seu experimento, Andrade (2008), testou diferentes tipos de fungicidas em explante de mangueira, Mancozeb, Tebuconazole, Procimidona e Benzimidazol, e observou maior eficiência no Tebuconazole para controlar contaminação fungica em explantes de mangueira.

4 CONCLUSÃO

A utilização da solução de hipoclorito de sódio a 2,0% por 20 minutos é eficiente para a assepsia de sementes de Rosa do deserto (*Adenium sp.*)

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. A contaminação *in vitro* de plantas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília 2006.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla King*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

DE ANDRADE, S. R. M. et al. Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, 2008.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2009.

FRÁGUAS, C. B. et al. **Propagação *in vitro* de espécies ornamentais**. 2004. 24 p. Dissertação (Mestrado Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de Lavras, 2004.

NIETSCHE, S. et al. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 989-991, 2006.

PAUL, A. L. et al. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic arabidopsis plants for a Space Shuttle flight experiment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 480-485, 2001.

PEREIRA, G. A.; CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande Naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v E, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, G. A. et al. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘IAC 2001’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

REGO, S. S. et al. DETECTION, transmission and pathogenicity of fungi on *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p 9-13, 2012.

SOUSA, G. C. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S1, p. 405-407, 2008.

TALUKDAR, T. Development Of NaCl – Tolerante line in an endangered ornamental, *Adenium multiflorum* Klotzsch through *in vitro* selection. **Recent Scientific Research**, Krishnagar, v. 3, n. 10, p. 812 -821, 2012.

VARELLA, T. L. et al. *In vitro* germination of desert rose varieties. **Ornamental Horticulture**, Tangara da Serra, V. 21, n. 2, p. 227-234, 2015.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; ALTERTHUM, F. Detecção, isolamento e preservação de microrganismos contaminantes da cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (editor técnico). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, p.163-185.

