



COMUNICADO
TÉCNICO

449

Colombo, PR
Julho, 2020

Embrapa

Metodologia de descontaminação e germinação de sementes de *Pinus taeda* L.

Regina Caetano Quisen
Juliana Degenhardt-Goldbach

Metodologia de descontaminação e germinação de sementes de *Pinus taeda* L.

Regina Caetano Quisen, Engenheira Florestal, doutora em Morfogênese e Biotecnologia de Plantas, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Juliana Degenhardt-Goldbach**, Engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR

O processo de eliminação de micro-organismos que promovem a contaminação na fase inicial do cultivo in vitro é considerado um dos gargalos para a definição de protocolos de micropropagação visando a produção massal de mudas clonais de espécies lenhosas. O sucesso no manejo destes contaminantes depende principalmente da eficácia de métodos de desinfestação do material vegetal (explante), os quais são objeto de estudos que visam determinar procedimentos específicos para cada espécie, com perdas em níveis aceitáveis e aplicáveis nas biofábricas (Scherwinski-Pereira, 2010; Oliveira et al., 2018).

No processo de assepsia superficial dos explantes, as substâncias com ação biocida mais comumente utilizadas são o etanol e compostos clorados, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Além destes, outros agentes podem ser relacionados como o cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio, nitrato de prata, fungicidas e peróxido de hidrogênio, com concentrações e tempo de exposição que variam de acordo com o tipo do explante.

Ainda pouco explorado na rotina da micropropagação, o peróxido de hidrogênio é citado por Barampuram et al. (2014) e Oliveira et al. (2019) como um desinfetante apresentando resultados positivos ao controle de contaminantes in vitro e com menor nível de danos aos tecidos. Este produto, rotineiramente empregado na escarificação de sementes de alguns cultivos agrícolas (Amjad et al., 2004; Çavusoglu; Kabar, 2010; Barampuram et al., 2014), também tem proporcionado uma melhora significativa no desempenho germinativo de sementes de espécies de coníferas com elevado grau de dormência tegumentar, tais como *Pseudotsuga menziesii* e *Pinus* spp. (Barnett, 1976; Ghildiyal et al., 2007; Cram; Fraedrich, 2010).

Assim, em razão dos resultados promissores e propriedades do peróxido de hidrogênio com relação à desinfestação e promoção da germinação de sementes, a Embrapa Florestas realizou estudos que resultaram no desenvolvimento de um protocolo de germinação in vitro de sementes de *Pinus taeda* L.. Neste caso, a metodologia, além de proporcionar a produção de explantes assépticos,

também influenciou na superação da dormência, com o aumento do desempenho germinativo das sementes (velocidade e uniformidade), representando avanço significativo para a propagação in vitro desta espécie.

A metodologia foi elaborada e disponibilizada com o objetivo de servir de base de consulta e aplicação para Laboratórios de Cultura de Tecidos com interesse no cultivo in vitro de *P. taeda*. Ademais, o peróxido de hidrogênio pode substituir as práticas de quebra de dormência conhecidas até o momento em viveiro, podendo ser usado em viveiros comerciais para a produção de mudas, principalmente devido à facilidade de aplicação, pequeno volume necessário e facilidade de lavagem do produto.

A adoção dos procedimentos sugeridos neste documento pode resultar em variações nos rendimentos em função das adaptações e condições específicas de cada laboratório. Desta forma, sugere-se seguir as orientações de acordo com o descrito, para que o resultado seja próximo ao obtido nos estudos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação da Embrapa Florestas.

Materiais, equipamentos e cuidados necessários

Para a execução desta metodologia serão necessários algumas vidrarias e

materiais de apoio, tais como: frascos de vidro com tampa, copo de Becker, balão volumétrico, pinças, papel filtro, caixas plásticas transparentes tipo gerbox, placas de Petri e água destilada. Todos estes materiais utilizados para o pré-tratamento das sementes, com exceção das caixas gerbox, devem ser previamente limpos e autoclavados. Recomenda-se a autoclavagem dos materiais e águas por 30 minutos, sob pressão de 1,1 Kgf cm⁻² e temperatura de 121 °C.

As caixas plásticas do tipo gerbox utilizadas para a germinação não podem ser autoclavadas e, portanto, devem ser lavadas com água e sabão e imersas em água clorada 5% (50 mL de hipoclorito de sódio comercial para 1.000 mL de água) por 2-3 horas no mínimo. Recomenda-se a secagem das caixas sob luz UV em câmara de fluxo laminar. Este procedimento deve ser bastante rigoroso, pois a eficiência da desinfestação dependerá destes cuidados.

Para o tratamento das sementes é necessária a utilização de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de pelo menos 40 V (volumes) ou de maior concentração. A água utilizada para a manutenção da umidade das caixas, ao longo do período de germinação das sementes, deve ser destilada e estéril (autoclavada). Os equipamentos mínimos necessários são: agitador orbital, câmara de fluxo laminar (com luz UV) e autoclave.

Solução de pré-tratamento

A solução de pré-tratamento deve ser preparada a partir de H_2O_2 com 40 V, no mínimo. Por exemplo, para preparar 100 mL de solução de H_2O_2 a 40 V, partindo-se de H_2O_2 a 200 V, aplica-se a seguinte fórmula de diluição:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

onde: $C1$ = concentração inicial (reagente estoque), $V1$ = volume da solução inicial a ser retirada, $C2$ = concentração final, $V2$ = volume total da solução a ser preparada.

Então,

$$200 \text{ V} \times 40 \text{ V} \times 100 \text{ mL}$$

$$V1 = 20 \text{ mL de } H_2O_2 \text{ a } 200 \text{ V}$$

Portanto, para se preparar a solução H_2O_2 a 40 V, colocar 20 mL de H_2O_2 a 200 V, em balão volumétrico de 100 mL e completar até o menisco com água deionizada.

Material vegetal

As sementes maduras de *P. taeda* devem estar sadias, limpas e secas. A manutenção prévia das sementes em ambiente de câmara fria ou geladeira (3 °C a 5 °C) em embalagem plástica de polietileno é essencial para manter a viabilidade do lote.

Tratamento pré-germinativo

Inicialmente, as sementes devem ser lavadas e colocadas em Becker com água, sendo descartadas sementes que boiarem (sementes chochas ou vazias). Em seguida, as sementes necessitam ser imersas em solução de peróxido de hidrogênio 40 V, em quantidade suficiente para cobri-las totalmente. O frasco tem que ser tampado e vedado com papel filme e colocado em agitador orbital sob temperatura ambiente, por 60 minutos, com 100 rpm–110 rpm.

Após o período de imersão, as sementes necessitam ser transferidas para ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar, para, então, serem lavadas abundantemente com água estéril para a eliminação completa de resíduos do peróxido de hidrogênio. Enquanto as sementes apresentarem pequenas bolhas aderidas ao tegumento será necessário repetir o procedimento de lavagem até a eliminação total das bolhas.

Semeadura

As sementes devem ser dispostas alinhadas em caixas plásticas transparentes do tipo gerbox, previamente forradas com duas folhas de papel filtro ume-decidas com água destilada estéril, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Semear no máximo 40 sementes por caixa e vedá-la com papel filme.

As caixas contendo as sementes devem ser colocadas para germinar em

sala de crescimento, com temperatura controlada de 23 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade com lâmpadas fluorescentes brancas.

A umidade do papel filtro deve ser mantida ao longo do período de germinação, sendo recomendada a observação diária da umidade nas caixas, e colocada quantidade mínima suficiente de água estéril sempre que necessária. As caixas devem ser abertas somente em ambiente de câmara de fluxo laminar e a água utilizada estéril (autoclavada). No caso de ocorrência de sementes com contaminação fúngica ou bacteriana durante o período de germinação, estas devem ser retiradas imediatamente das caixas. Quando a contaminação ocorrer em uma área maior da caixa, deve-se eliminar todas as sementes.

Ao final de 30-40 dias, as plântulas já estarão formadas, sendo possível o corte dos explantes desejados para a cultura in vitro.

Com base nos resultados obtidos de ensaios realizados e de lotes de sementes avaliados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação da Embrapa Florestas e também nas condições especificadas anteriormente, espera-se, a partir de sementes maduras de *P. taeda*, o seguinte:

- Período de germinação: início a partir do 5°C–7 °C dia até 19 °C–20 °C dia após a semeadura.
- Tempo médio de germinação de 10,8 dias.
- Percentagem de germinação entre 79,8% e 83,0%.

- O tempo necessário para a obtenção de explantes pode variar de acordo com o fragmento de tecido ou órgão desejado, sendo que 30-40 dias após germinação as plântulas já apresentam parte aérea e radícula bem desenvolvidas, sem atrofiamento.

Referências

AMJAD, H.; SHAFQAT, F.; NAYYER, I.; RUBINA, A. Influence of exogenous application of hydrogen peroxide on root and seedling growth on wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 6, n. 2, p. 366-369, 2004.

BARAMPURAM, S.; ALLEN, G.; KRASNYSKI, S. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 179-185, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0472-x>.

BARNETT, J. P. Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide. **Tree Planters' Notes**, v. 27, n. 3, p. 17-19, 1976.

ÇAVUSOGLU, K.; KABAR, K. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 4, n. 1, p. 70-79, 2010. DOI: <https://doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.9>.

CRAM, M. M.; FRAEDRICH, S. W. Seeds diseases and seed borne pathogens of North America. **Tree Planter's Notes**, v. 53, n. 2, p. 35-44, 2010.

GHILDIYAL, S. K.; SHARMA, C. M.; KHANDURI, V. P. Improvement in germination of Chirpine (*Pinus roxburghii*) by a presowing treatment with hydrogen peroxide. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 19, n. 2, p. 113-118, 2007.

OLIVEIRA, D. V. de O.; SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. S.; MARTINS, I. S.; MUNDIM,

R. C.; ALVES, R. de B. das N. **Procedimento simplificado para descontaminação, introdução e multiplicação in vitro de explantes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018. 24 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 335).

OLIVEIRA, R. C. de; ASMAR, S. A.; SILVA, H. F. de J.; MORAIS, T. P. de; LUZ, J. M. Q. Regulators, culture media and types of lights in vitro lavender culture. **Ciência Rural**, v. 49, n. 11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180966>.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446 p.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão digital (2020)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Neide Makiko Furukawa

Membros

Annete Bonnet

Cristiane Aparecida Fioravante Reis

Guilherme Schnell e Schühli

Krisle da Silva

Marcelo Francia Arco-Verde

Marcia Toffani Simão Soares

Marilice Cordeiro Garrastazu

Valderês Aparecida de Sousa

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

Foto capa:

Regina Caetano Quisen