



DESCONTAMINAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PINUS

DECONTAMINATION AND SEED GERMINATION OF PINUS

Camila Rocha Zinga¹; Juliana Degenhardt²; Regina Caetano Quisen²

¹Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Positivo, Curitiba, PR; ²Embrapa Florestas, Colombo, PR. E-mail: camilarochazinga@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A utilização de plântulas germinadas in vitro como fonte de explantes tem como vantagem a juvenildade dos tecidos e exploração da variabilidade genética proporcionada por espécies alógamas, tal como o *Pinus* (GOLLE et al., 2014). No entanto, a perda de explantes resultante da contaminação microbiana que ocorrem na introdução in vitro é considerada um problema na micropropagação, chegando a prejudicar a condução de experimentos em função do número reduzido de explantes obtidos e inviabilizar a produção massal de determinadas espécies em laboratórios comerciais.

Tradicionalmente, os agentes de esterilização de superfície de sementes mais utilizados incluem o etanol, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e cloreto de mercúrio (COSTA; SCHERWINSKI-PEREIRA; OTONI, 2010; BARAMPURAM; ALLEN; KRASNYANSKI, 2014), sendo a aplicação de antibióticos, fungicidas, extratos e óleos essenciais, voltada para o controle de contaminações endofíticas (RIBEIRO e BASTOS, 2008). Ademais destes, o peróxido de hidrogênio, que além de utilizado com sucesso na assepsia de sementes de vários cultivos agrícolas (AMJAD et al. 2004; ÇAVUSOGLU; KABAR 2010), também tem proporcionado uma melhora significativa na germinação de sementes de coníferas florestais, tais como em *Pseudotsuga menziesii* e alguns *Pinus* spp. (BARNETT, 1976; GHILDIYAL; SHARMA; KHANDURI, 2007).

No caso do *Pinus taeda*, espécie com forte dormência nas sementes, na qual é necessária estratificação a frio para superação da contenção tegumentar (CARPITA et al. 1983; BRASIL, 1992), o desenvolvimento de metodologias com agentes desinfestantes que além de reduzir a perda de explantes a níveis aceitáveis, também influencie no aumento do desempenho germinativos das sementes, pode representar avanços significativos para a propagação in vitro desta espécie. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tratamentos com peróxido de hidrogênio na desinfestação e germinação de sementes de *Pinus taeda* L., visando a produção de explantes assépticos para introdução in vitro.

MATERIAL E MÉTODOS



O presente ensaio foi conduzido no Laboratório de Culturas de tecidos e Transformação da Embrapa Florestas, em Colombo, Paraná. Foram utilizadas sementes de *Pinus taeda* L. obtidas em plantio PCS de 1,5 geração, obtidas comercialmente.

As sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos: (T1) Tratamento controle – sementes sem tratamento pré-germinativo; (T2) Embebição das sementes em H₂O₂ a 40 volumes por 60 minutos; (T3) Embebição das sementes em H₂O₂ a 10 volumes por 48 horas. A germinação das sementes foi conduzida em caixas gerbox contendo duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada estéril na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, e mantidas em sala de crescimento com 23±2°C e fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, obtida através de lâmpadas fluorescentes brancas.

Diariamente foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, sendo contabilizadas aquelas com protusão radicular de 2-3 mm. Ao final de 30 dias foi realizada a análise da germinação e desempenho das plântulas formadas, considerando-se as variáveis: formação de plântulas normais (parte aérea e radícula bem desenvolvidas, sem atrofiamento) ou anormais (com retorcimento da parte aérea, emissão dos primórdios foliares sem a protusão da radícula e aderência do tegumento, e parte aérea não formada ou retida pelo perisperma), germinação incompleta (protusão da radícula com pouco desenvolvimento), sementes duras (sementes sem germinação, mas com aparência normal) e sementes contaminadas. Com base nos dados foram calculados: a porcentagem final de formação de plântulas normais (%GPN) e de plântulas anormais (%GPA), a porcentagem final de sementes com germinação incompleta (RAD%) ou sementes duras (%DUR), a porcentagem de perdas por contaminação (%PER), o índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TM) e frequência relativa da germinação (Fr). O IVG, TM e Fr foram calculados através do índice determinado pela fórmula de Maguire (1962), pela equação proposta por Labouriau (1983) e de Labouriau e Valadares (1976), respectivamente. O vigor foi avaliado levando-se em consideração a avaliação visual da parte aérea e sistema radicular das plântulas formadas.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento com 28 a 30 sementes cada. As porcentagens de germinação foram transformadas para $\arcseno\sqrt{x/100}$ e os valores do índice de velocidade de germinação, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para fins de análise estatística. Os dados para interpretação foram apresentados com as médias dos dados originais. As médias de germinação e índice de velocidade de germinação foram comparados através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado na Tabela 1, os tratamentos com H₂O₂ afetaram significativamente o processo germinativo das sementes de *Pinus taeda* com base na análise do vigor, onde a porcentagem de plântulas normais formadas para as sementes controle (0,9%) foi significativamente menor que as



porcentagens para as sementes tratadas, seja com curto ou longo período de embebição em H₂O₂, com 79,8% e 69,8% respectivamente. Para a variável sementes inertes (%DUR) houve diferença significativa com maior porcentagem apresentada no tratamento controle, com 89,4%, enquanto os demais tratamentos apresentaram porcentagens inferiores. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as demais variáveis (%PLA, %RAD e %PER).

TABELA 1 – Efeito de tratamentos pré-germinativos em sementes de *Pinus taeda* L. sobre a formação de plântulas normais (%PLN), plântulas anormais (%PLA), emissão de radícula (%RAD), sementes inertes (%DUR), perdas por contaminação (%PER) e IVG após 30 dias. Colombo, PR, 2018.

Tratamento	%PLN	%PLA	%RAD	%DUR	%PER	IVG
Controle	0,8 B	0,0 ^{ns}	4,4 ^{ns}	89,4 A	5,3 ^{ns}	0,08 B
H ₂ O ₂ 60 min	79,8 A	0,9 ^{ns}	9,7 ^{ns}	7,8 B	0,9 ^{ns}	2,63 A
H ₂ O ₂ 48h	69,8 A	3,4 ^{ns}	8,4 ^{ns}	8,4 B	10,1 ^{ns}	2,99 A

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos de embebição em solução de H₂O₂ proporcionaram a melhoria da taxa de germinação (Tabela 1), corroborando com os resultados de diversos autores com *Pinus* sp. e outras espécies florestais (HOEFNAGELS; LINDERMAN, 1999; ROBLEDO PAZ; VILLALOBOS ARAMBULA; SANTACRUZ, 2009; CRAM; FRAEDRICH, 2010). Esta melhoria no processo germinativo, de acordo Ogawa e Masaki (2001) pode ser atribuída à atividade oxidante do peróxido de hidrogênio, que suprime a atividade dos inibidores da germinação no tegumento da semente. O tegumento duro e espesso das sementes de *P. taeda*, que representa a principal restrição à germinação de sementes da espécie, consiste em uma barreira física ao alongamento da radícula, e segundo Barnett (1976), restringe as trocas gasosas e a absorção de água nas sementes. Embora se configure como uma restrição mecânica, Barnett (1976), corroborado por Cooke, Cooke e Gifford (2002), descrevem a possibilidade da existência de outros fatores de efeito inibitório derivados do tegumento das sementes em *P. taeda*, que necessitam de mais estudos definitivos.

Takacs (1964) por sua vez, também avaliando tratamentos similares em sementes de *P. taeda*, observou que, restringir a aplicação do peróxido em menor tempo pode evitar danos irreversíveis à germinação ou formação da plântula. Neste caso, no presente trabalho pode-se verificar que o uso de embebição por período mais curtos, mesmo que em maior concentração de peróxido, promoveu satisfatoriamente a germinação com baixa porcentagem de plântulas anormais formadas.

De forma semelhante à germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 1) foi afetado pelos tratamentos aplicados, sendo possível observar que, para as sementes com tratamentos pré-germinativos houve maior vigor, pois diferiram estatisticamente das sementes não tratadas (controle). A avaliação visual do vigor das plântulas normais permitiu observar que as plântulas no T2 apresentaram maior desenvolvimento comparadas as formadas no T3, com raízes mais longas e maior altura. Para a variável PLA, mesmo sem diferença significativa entre os tratamentos



com H_2O_2 , no T2 a média obtida de plântulas anormais formadas foi de 0,9%, enquanto no T3 foi de 3,4%.

Ademais da vantagem de produzir grande porcentagem de explantes livres de contaminantes para introdução *in vitro*, a aplicação do peróxido de hidrogênio é um procedimento simples e de baixo custo, mais rápido do que os processos tradicionais para quebra de dormência para o *Pinus taeda* de estratificação a frio, que demandam de pelo menos 30 dias em ambientes refrigerados a 3-5°C (BRASIL, 1992). Os tratamentos com embebição em solução de H_2O_2 proporcionaram a redução na média de dias para a ocorrência da germinação em relação à testemunha, de 24,5 dias para 10,6 dias e 8,9 dias (T2 e T3, respectivamente). Na distribuição das frequências relativas diárias de germinação (Figura 1) observou-se que os picos de germinação para os tratamentos com H_2O_2 ocorreram entre 5°-13° dias, enquanto para o tratamento controle foi entre o 20°-25° dias. Neste último, verificou-se um aumento no tempo médio de germinação (TM), devido à velocidade ter sido mais lenta, possivelmente em função da ausência do H_2O_2 que nos tratamentos T1 e T2 auxiliaram na superação da dormência tegumentar, permitindo a absorção de água.

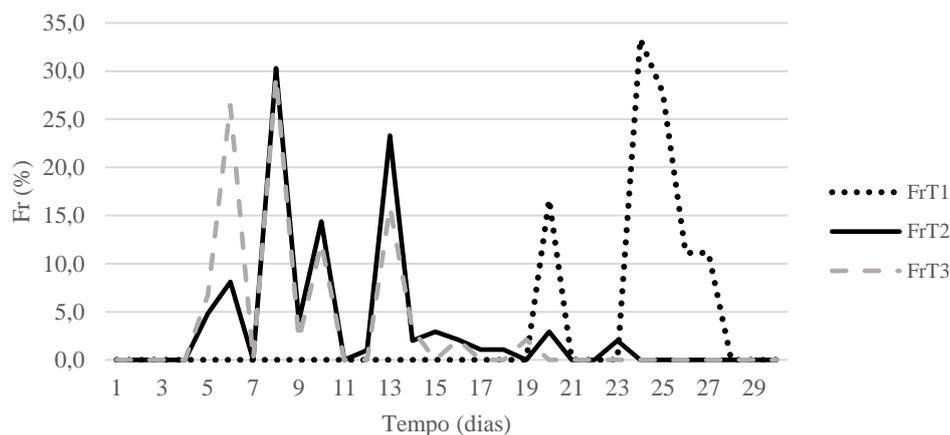


FIGURA 1 - Frequência relativa (Fr) da germinação de sementes de *Pinus taeda* em função dos tratamentos pré-germinativos, onde T1 - Tratamento controle; T2 - Embebição em H_2O_2 (40 volumes) por 60 minutos; T3 - Embebição em H_2O_2 (10 volumes) por 48 h.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o uso de solução de peróxido de hidrogênio para a quebra de dormência tegumentar de sementes de *Pinus taeda* diminuiu o tempo médio e elevou o percentual de germinação, produzindo plântulas completas que podem ser utilizadas como fonte de explante assépticos, indicando o método como uma alternativa eficiente e prática para a preparação de explantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro*.

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**, Beijing, v.6, n.2, p.366–369, 2004.
- BARAMPURAM, S.; ALLEN, G; KRASNYANSKI, S. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, v.118, n.1, p.179-185, 2014.
- BARNETT, J.P. Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide. **Tree Planters' Notes**, Washington, v.27, n.3, p.17-19, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- CARPITA, N.C.; SKARIA, A.; BARNETT, J.P.; DUNLAP, J.R. Cold stratification and growth of radicles of loblolly pine (*Pinus taeda*) embryos. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.59, n.4, p.601-606, 1983.
- 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.
- COOKE, J.; COOKE, B.; GIFFORD, D. Loblolly pine seed dormancy: constraints to germination. **New Forest**, v.23, n.3, p.239-256, 2002.
- COSTA, M.G.C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; OTONI, W.C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Ed. Tec.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.17-59, 2010.
- CRAM, M.M.; FRAEDRICH, S.W. Seeds diseases and seed borne pathogens of North America. **Tree Planter's Notes**, Washington, 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**, Selangor, v.19, n.2, p.113-118, 2007.
- GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; MUNIZ, M.F.B.; HANAUER, J.; FLÔRES, A.V.; LÉON, E.A.B. Seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* L. para a cultura de tecidos. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 2, p. 259-266, June 2014.
- HOEFNAGELS, M.H.; LINDERMAN, R.G. Biological suppression of seedborne *Fusarium* spp. during cold stratification of Douglas fir seeds. **Plant Disease**, v.83, n.9, p.845–852, 1999.
- LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174p.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.



OGAWA, K.; MASAKI; M. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.42, n.3, p.286–291, 2001.

RIBEIRO, J.M.; BASTOS, D.C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 26 p. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 214)

ROBLEDO PAZ, A.; VILLALOBOS ARAMBULA, V.; SANTACRUZ, A. Efficient differentiation of adventitious shoots in cotyledons of *Pinus maximartinezii* Rzedowski, **Acta Botanica Mexicana**, Michoacán, v.89, n.1, p.47-62, 2009.

TAKACS, E.A. Utilización del agua oxigenada concentrada para estimular la germinación de *Pinus taeda* L. **IDIA**. Suplemento Forestal, n.12, p.45-46, 1964.