

## PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE DENTE DE LEÃO E DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO DE ASSEPSIA PARA SEMENTES

Kamila Cristina de Credo Assis<sup>1</sup>

Cintia Moda Salatino Guardabaxo<sup>2</sup>

Guilherme Serra Geraldo<sup>3</sup>

Gladys Romero Guerrero<sup>4</sup>

### Agroecologia e Produção Agrícola Sustentável

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a propagação *in vitro* de sementes de *T. officinale* e determinar qual o melhor método de assepsia. O presente foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos no Departamento de Ciências Agrárias da UDCA na Colômbia de agosto a novembro de 2017. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições e cinco sementes por parcela. Os tratamentos foram divididos em esquema fatorial (4x2) com 4 concentrações de hipoclorito de sódio (2%, 3%, 4% e 5%) e dois tempos de imersão (5 e 10 minutos). A assepsia de sementes de *T. officinale* para cultivo *in vitro* eficiente foi obtida com concentrações de 4% e 5% de hipoclorito de Sódio no tempo de cinco minutos. O dente de leão é tóxico a altas concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito e existe elevada queda na porcentagem de germinação ao submetê-las a tal.

**Palavras-chave:** Micropropagação; Plantas Medicinais; *Taraxacum officinale*.

#### INTRODUÇÃO

Dados da FAO (2010) estimam que atualmente 75% dos alimentos do mundo vêm de apenas 150 espécies de plantas, com apenas quatro (arroz, milho, trigo e batatas) contribuindo com aproximadamente 60% das necessidades alimentares mundiais.

A prioridade dada às chamadas culturas economicamente importantes levou à redução da diversidade de alimentos disponíveis para a humanidade por muitas gerações. O chamado "paradoxo nutricional" tem suas raízes na "simplificação" da agricultura, um processo que favoreceu algumas culturas em detrimento de outras, com base em suas vantagens comparativas: o desenvolvimento de uma ampla gama de habitats, as necessidades das

- 
1. Discente do curso de Engenharia Agrônômica – IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. [kamilac.cassis@hotmail.com](mailto:kamilac.cassis@hotmail.com)
  2. Discente do curso de Engenharia Agrônômica – IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. [cintaguardabaxo@gmail.com](mailto:cintaguardabaxo@gmail.com)
  3. Discente do curso de Engenharia Agrônômica – IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. [gui\\_geraldo@hotmail.com](mailto:gui_geraldo@hotmail.com)
  4. Doutora em Melhoramento Genético de Plantas, Docente investigativa, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientale, UDCA, Colômbia.. [glromero@udca.edu.co](mailto:glromero@udca.edu.co)

culturas simples, fácil armazenamento e processamento, propriedades nutricionais, sabor, etc (GEORGE, E. F.; SHERRINGTON P. D, 1995).

Os países devem assumir uma posição clara de defesa de seu patrimônio biológico perante a comunidade internacional para impedir sua destruição. Existem vários casos de países que exploram espécies vegetais de grupos indígenas da Amazônia para a produção de medicamentos (SAÚDE VITAL, 1991).

O *T. officinale* é uma planta nativa da Europa (Silva et al., 1995), tem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nativa ou climatizada, a partir dos limites da área glacial quase em linha Equador (PIO CORREIA, 1984). Apesar do conhecimento e aplicação popular e de suas propriedades medicinais, o dente-de-leão foi mencionado apenas nos compêndios terapêuticos do século XV, por suas propriedades diuréticas. (KISSMANN & GROTH, 1992).

A cultura *in vitro* é agora uma parte integrante de muitas plantas sistemas de produção de peças e hortícolas, como a ciência, é de grande importância para a compreensão de aspectos fisiológicos, genéticos e fitossanitários de plantas e cultivada. No entanto, para que a técnica atinja o objetivo, é essencial desenvolver protocolos eficazes. Muitas vezes, os maiores desafios para a aplicação das técnicas de cultura *in vitro*, particularmente em espécies pouco estudados, são contaminações de microrganismos endógenos e exógenos (SKIRVIN et al., 1999).

O dente-de-leão possui várias propriedades medicinais e seu desuso é maléfico para o desenvolvimento de pesquisas médicas, agrônomicas e nutricionais. É necessário para o desenvolvimento de cultivos de espécies sub-exploradas que o incentivo seja ampliado e o número de investigações sobre a caracterização, propagação, floração das mesmas. A cultura *in vitro* é muito bem valorizada para a obtenção de mudas livres de doenças para obtenção de culturas vigorosas e produtivas. Neste contexto que o presente estudo se insere com o objetivo avaliar a propagação *in vitro* das sementes de *T. officinale* e determinar o melhor método de assepsia das sementes e sua influência na germinação.

## **METODOLOGIA**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, no período de agosto a novembro de 2017. Como fonte de explantes, foram utilizadas sementes provenientes de plantas adultas de *T. officinale* encontradas nas coordenadas 4°48'1.70"N e 74° 2'57.76"O.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado - DIC, em esquema fatorial 5x2, sendo os tratamentos compostos por diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%) e dois tempos de imersão (5 e 10 minutos). Foram utilizadas quatro repetições e cinco sementes por parcela que foram inoculadas em frascos 250cm<sup>3</sup> com 50mL de meio de cultura. As sementes após os tratamentos antissépticos passaram por tri-lavagem com água destilada em câmara de fluxo laminar e foram inoculadas em meio ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e adicionado 3 gotas de Tween 20, antes da adição do ágar e, em seguida, o meio foi esterilizado a 120 °C e 1,5 atmosferas de pressão, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em câmara tipo B.O.D. com irradiância em torno de 35 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas. Decorridos 45 dias da instalação, foram analisados: porcentagem de contaminação fúngica (%), porcentagem de contaminação bacteriana e taxa de germinação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com o emprego do Software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo a diferença significativa entre tratamentos determinada pelo teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes a contaminação por fungos e bactérias presentes no cultivo *invitro* de sementes de *T. officinale in vitro* encontram-se na Tabela 1.

A partir da análise de variância, constatou-se que existe interação entre os fatores estudados e a contaminação do meio por fungos e bactérias.

Tabela 1. Contaminação de sementes de *T. officinale*, submetidas a combinações de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão (UDCA- Colômbia – 2017)

Hipoclorito de sódio (%)	Tempo de imersão (min)			
	5	10	5	10
	Contaminação por fungos (%)		Contaminação por bactérias (%)	
0	100 cA*	100 cA	100 cA	100 cA
2	100 cB	40 bA	58 bA	42 bA
3	76 bB	12 aA	41 bB	17 aA
4	20 aA	8 aA	28 aB	8 aA
5	9 aA	3 aA	12 aA	8 aA
CV(%)	15,27			

(\*) Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste Scott Knott ao nível de 0,05 de significância.

A partir dos dados de contaminação das sementes de dente de leão *in vitro* (Tabela 1) pode-se observar que o tempo de 10 minutos foi mais eficiente para a assepsia nas concentrações de 2 e 3 % para a contaminação fúngica e de 3 e 4 % para a bacteriana. Nos demais tratamentos o tempo não influenciou estatisticamente o controle da contaminação. Resultados diferentes foram encontrados por Chaves et al. (2004), que trabalhando com *Prunus* sp., verificaram baixo índice de contaminação em explantes tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 1% 1,5% e 2% em 10 minutos.

No tempo de cinco minutos observou-se controle eficiente para a ambas contaminações somente nas concentrações superiores a 4% de hipoclorito de sódio. Já para o tempo de dez minutos observou-se que em concentrações iguais ou superiores a 3% de hipoclorito foi suficiente para controle da contaminação por bactérias e fungos no meio de cultura. Resultados diferentes foram encontrados por Batista et al. (2017) que desenvolvendo protocolo de assepsia em explantes de *Euterpe precatoria* Mart. encontrou controle significativo dos contaminantes com 20 minutos em concentrações de 2% de Hipoclorito de sódio.

Quanto à germinação (Figura 1) observa-se que à medida que as concentrações de hipoclorito de sódio aumentam no tempo de 5 minutos houve decréscimo polinomial no teor germinativo das plantas. Durante o tempo de 10 minutos observou-se que a diminuição do conteúdo germinativo em função da concentração de hipoclorito de sódio também ocorreu, mas em forma linear de forma muito mais acentuada.

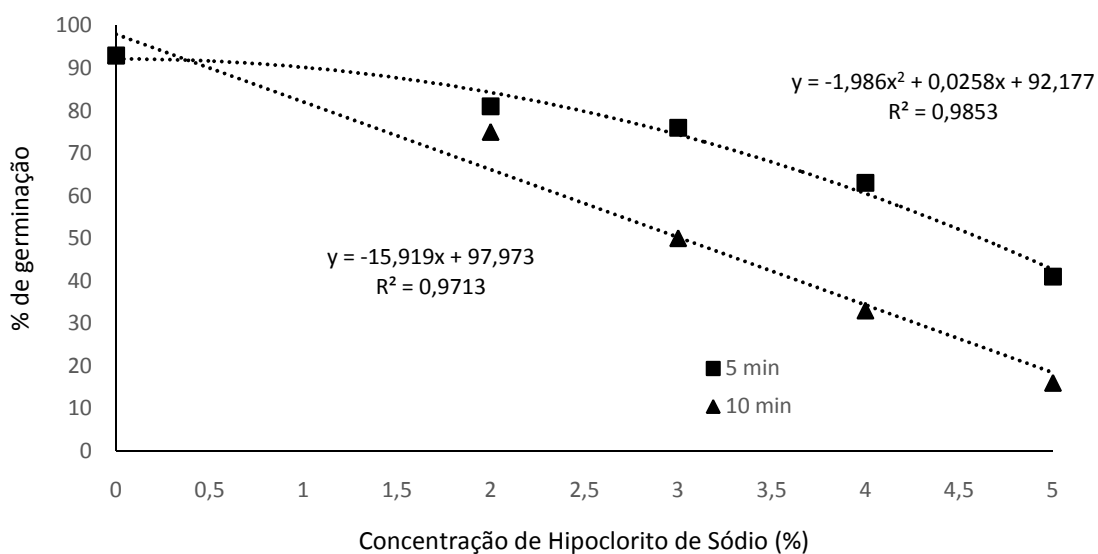


Figura 1. Porcentagem de germinação de sementes de *T. officinale* com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e diferentes tempos de assepsia. (UDCA-Colômbia-2017).

As sementes de dente leão apresentaram queda acentuada no teor germinativo com o aumento das concentrações de hipoclorito de sódio evidenciando a necessidade de avaliar outros solutos para sua desinfecção. Nietsche et al. (2006) afirmaram que o hipoclorito de sódio é tóxico para as sementes e dependendo do tempo de imersão, a desidratação dos explantes e sementes pode ocorrer.

## CONCLUSÕES

A assepsia de sementes de *T. officinale* para cultivo *in vitro* eficiente foi obtida com concentrações de 4% e 5% de Hipoclorito de Sódio no tempo de cinco minutos.

O dente de leão é tóxico a altas concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito e existe elevada queda na porcentagem de germinação ao submetê-las a tal.

## REFERÊNCIAS

- BATISTA, B. N.; RAPÔSO, N. V. M.; LIBERATO, M. A. R. Determinação do protocolo de assepsia para reprodução *in vitro* de *Euterpe precatoria* MART. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v.11, n.1), p.1-118, 2017.
- CHAVES, A.C; SCHUCH, M.; WALMOR, B. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10. n.2, p. 249-250, 2004.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**. V.35, n.6. Lavras. Nov./Dec.2011.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. Eversley, Basingstoke, 7ª ed., Wiley. **Journal of Basic Microbiology**, v. 25, 475 p., 1985
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo; BASF Brasileira S.A., 1992. t2. p.358-362.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473- 497, 1962.
- NIETSCHKE, S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.989-991, 2006.
- PIO CORREA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, 1984. v.2. p. 525-6.
- SAÚDE VITAL. **Curas alternativas**. São Paulo: Ed. Azul, ed. especial; 1991.
- SILVA, I. et al. **Noções sobre o organismo humano e a utilização de plantas medicinais**.4. ed. Cascavel: Assoeste, 1995. p. 130-131.
- SKIRVIN, R. M. et al. Establishment of contaminant-free perennial plants on vitro. *In vitro cellular & developmental Biology-plant*, v. 35, n°4, p. 278-290, 1999