

Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura

In vitro germination of beetroot seeds treated with GA_3 and sucrose

Heder Braun¹; José Carlos Lopes^{2*}; Leandro Torres de Souza³; Edilson Romais Schmidt⁴; Rithiely Paschoa Queiroz Cavatte⁵; Paulo Cezar Cavatte⁶

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de sementes de beterraba, cv. Early Wonder Tall Top, tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, em um esquema fatorial 2 x 5, com cinco repetições. Os tratamentos foram sementes pré-embebidas em ácido giberélico (GA_3) e sementes pré-embebidas em água destilada por seis horas, mantidas em cinco concentrações de sacarose no meio de cultura (0; 15; 30; 45; e 60 g L⁻¹). Sementes tratadas com GA_3 , mantidas no meio de cultura com sacarose na concentração de 15 g L⁻¹, apresentam maior porcentagem de germinação, enquanto plântulas mais vigorosas foram obtidas a partir de sementes mantidas nos meios suplementados com 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: *Beta vulgaris*, meio de cultura, substrato, cultivo *in vitro*, vigor

Abstract

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination of beetroot seeds, cv. Early Wonder Tall Top, treated with gibberellic acid and sucrose at different concentrations. A randomized complete block design in a 2 x 5 factorial arrangement with five replications was used. The beetroot seeds were pre-soaked in gibberellic acid (GA_3) and distilled water during six hours, maintained of five concentration of culture medium (0, 15, 30, 45, 60 g L⁻¹). Seeds treated with GA_3 and maintained in medium with sucrose in the concentrations of 15 g L⁻¹ presented the highest germination, while seedlings with the highest vigor were obtained with seeds maintained in the medium at 15 and 30 g L⁻¹ of saccharose.

Key words: *Beta vulgaris*, culture médium, substrate, in vitro culture, vigor.

¹ Doutorando em Fitotecnia, Bolsista CNPq, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. E-mail: hederbraun@hotmail.com

² D.Sc., Professor, Depto. de Produção Vegetal – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), Alto Universitário, s/n, C. Postal 16, CEP:29500-000, Alegre-ES, Tel: (28)3552-8950. E-mail: jcufes@bol.com.br

³ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Bolsista CAPES, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. E-mail: souzalts@yahoo.com.br

⁴ Professor, Depto. de Ciências da Saúde, Biológicas e Agrárias do CEUNES, São Mateus-ES. E-mail: edilson@ceunes.ufes.br

⁵ Doutoranda em Fisiologia Vegetal, Bolsista CAPES, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. E-mail: rithi.pqc@hotmail.com

⁶ Doutorando em Fisiologia Vegetal, Bolsista CNPq, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. E-mail: cavattepc@hotmail.com

* Autor para correspondência

Introdução

Na horticultura, a técnica de cultura de tecidos tem encontrado aplicações práticas e comerciais. O cultivo *in vitro*, em especial a cultura de meristemas, pode resultar na multiplicação mais eficiente, com obtenção de materiais de melhor qualidade (MINAMI, 1991). A micropropagação *in vitro* pode ser útil na produção de plantas com alta qualidade sanitária, isentas de vírus, além de ser uma ferramenta importante para a manutenção e o intercâmbio de germoplasma (ASSIS, 1999; FLETCHER; FLETCHER, 2001).

Na beterraba (*Beta vulgaris* L.), a estrutura tecnologicamente denominada de semente, é normalmente multigérmica, apresentando de dois a cinco aquênios formados pela junção de várias unidades florais, constituindo um espesso pericarpo corticoso. Cada aquênio contém um óvulo que originará uma semente botânica e, quando semeado, cada aquênio origina de três a cinco plântulas (GEORGE, 1999; FILGUEIRA, 2000). Entretanto, apresenta desuniformidade e lentidão no processo germinativo (LOPES; ZONTA; CAVATTE, 2004).

No caso das olerícolas, o período decorrido entre a semeadura e a emergência das plântulas pode influenciar o tempo requerido para a maturação e, conseqüentemente, a produção comercializável de diversas espécies (CURRAH, 1978 citado por COSTA; VILLELA, 2006). De acordo com Eira e Marcos Filho (1990), um dos mais importantes sintomas do declínio da qualidade fisiológica é a lentidão do processo de germinação das sementes, acompanhada pelo aumento do período decorrido entre a germinação da primeira e da última semente de um lote e conseqüente desuniformidade entre plântulas de um mesmo lote. Além disso, quanto maior o tempo requerido para a emergência das plântulas, maiores os riscos oferecidos por estresses abióticos e bióticos no campo (KHAN et al. 1983).

De acordo com Gomes (1999), as condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser fornecidas em laboratórios

pela multiplicação *in vitro*. Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996). Segundo Souza (2003), dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Porém, especula-se que a adição de sacarose ao meio de cultura favoreça a manutenção das plântulas *in vitro* por maior período de tempo. Nesse sentido, Pereira et al. (2006) verificaram que embriões de murmuru, em estágio maduro, necessitam de sacarose na concentração de até 15 g L⁻¹ no meio de cultura para aumentar a taxa de germinação, enquanto Salles et al. (2006), conseguiram obter maiores porcentagens de germinação de grãos de pólen das cultivares cítricas Natal, Valência e Pêra no meio de germinação contendo 100 g L⁻¹ de sacarose.

Riquelme, Guiñazu e Tizio (1991), na Argentina, estudaram o efeito de várias concentrações de sacarose (0 a 60 g L⁻¹) na etapa de pré-acondicionamento *in vitro* de plântulas de morangueiro, batata, menta e videira. Os resultados demonstraram que doses de 30 a 45 g L⁻¹ foram as mais adequadas durante o pré-condicionamento *in vitro* e posterior sobrevivência durante a fase de aclimatização.

O uso de ácido giberélico na fase de germinação melhora o desempenho das plântulas, acelerando a velocidade de emergência e realçando o potencial das sementes de várias espécies. Segundo Khan (1978), o uso de compostos químicos biologicamente ativos, como reguladores de crescimento, pode cessar ou diminuir o impacto de fatores adversos na qualidade e desempenho das sementes.

As giberelinas têm papel chave na germinação de sementes, estando envolvidas tanto na superação da dormência como no controle de hidrólise das reservas, pela indução da síntese de novo da α -amilase, enzima responsável pela hidrólise do amido. O ácido giberélico, considerado ativador enzimático endógeno, promove a germinação e

sua aplicação exógena influencia o metabolismo protéico, podendo dobrar a taxa de síntese de proteínas das sementes. Sendo assim, sementes que possuem baixa concentração relativa de giberelina, quando tratadas com ácido giberélico (GA_3) na concentração adequada apresentariam maior taxa e uniformidade de germinação, principalmente pela sua atuação no alongamento celular, fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem o seu crescimento (McDONALD; KHAN, 1983; TAIZ; ZEIGER, 2004). Em sementes de alface, colocadas para germinar em condições de escuro a 20 °C, o ácido giberélico, quando comparado com a testemunha (0,0) estimulou a germinação ao ser aplicado nas concentrações de 25; 50; 100 e 200 mg L⁻¹, sem contudo diferirem entre si (CUNHA; CASALI, 1989).

Outro importante efeito das giberelinas é a ação que exerce sobre o metabolismo dos glicídios envolvidos no fornecimento de energia às células, o que pode contribuir para tornar o potencial osmótico celular mais negativo. Como resultado da redução do potencial osmótico, ocorre maior fluxo de água, aumentando a sua velocidade para o interior da célula, favorecendo assim sua expansão. Além desses efeitos, parece evidente que as giberelinas aumentam a plasticidade da parede celular, controlando a ação de determinadas enzimas, que podem regular o fluxo de água nas células durante a expansão (HUTTLY; PHILLIPS, 1995; DAYKIN et al., 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com GA_3 em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-

ES. Utilizaram-se sementes de beterraba cv. Early Wonder Tall Top. As sementes foram desinfetadas por imersão em Thiophanate Methyl (0,5 g L⁻¹ de Methyl Thiofan) durante 10 minutos, sob agitação. A desinfecção das sementes foi complementada por imersão, durante um minuto, em solução de álcool 70%, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 15 minutos, enxaguando-as por três vezes consecutivas em água destilada e autoclavada.

Os tratamentos utilizados foram sementes pré-embebidas em água destilada e sementes pré-embebidas em ácido giberélico (GA_3) na concentração de 1,0 mg L⁻¹, por seis horas, mantidas em cinco concentrações de sacarose no meio de cultura (0; 15; 30; 45; e 60 g L⁻¹), em um esquema fatorial 2 x 5.

A semeadura foi realizada sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar horizontal, sendo os tratamentos mantidos a 27±2 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

Para a germinação *in vitro*, foi utilizado meio de cultura esterilizado através de autoclavagem, a 121 °C a pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos. O meio de cultura utilizado continha sais e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) e complementos orgânicos em mg L⁻¹: sacarose 30.000; myo-inositol 100. O pH foi ajustado para 5,7±0,1, antes da adição do ágar, utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N. Os meios de cultura foram solidificados com 7,0 g L⁻¹ de Agar Lafam, distribuindo-se 30 mL em tubos de ensaio contendo os tratamentos.

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições de 25 sementes. A avaliação foi feita pela porcentagem de germinação, massa fresca e seca de plântulas, aos 65 dias após a semeadura. Os dados foram submetidos à análise de variância e os modelos de regressão ajustados e testados através do teste “t” a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAEG 5.0 (EUCLYDES, 1983).

Resultados e Discussão

A maior porcentagem de germinação foi obtida com sementes tratadas com o GA₃ na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. Por outro lado, as sementes sem pré-embebição em solução de GA₃ apresentaram um decréscimo na germinação à

medida que aumentou o nível de sacarose no meio de cultura (Figura 1A). Pereira et al. (2006) verificaram que embriões de murmuru em estágio maduro necessitam de concentrações não superiores a 15 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura para as melhores taxas de germinação, apesar de necessitarem de concentrações superiores para sustentar o posterior crescimento das plântulas.

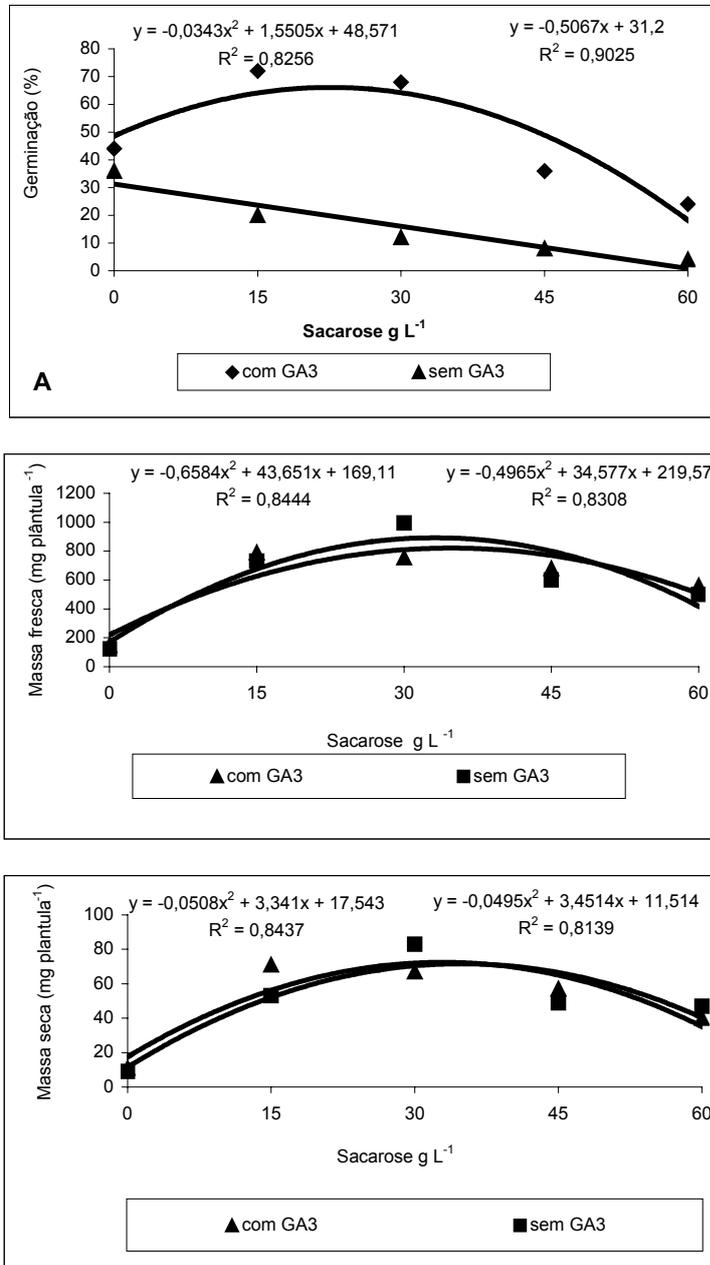


Figura 1. Germinação (A), massa fresca (B) e massa seca de plântulas (C) de sementes de beterraba, cv. Early Wonder Tall Top, semeadas em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose. CCA-UFES, Alegre (ES), 2007.

Estudando sementes de *Hancornia speciosa* Gomez, Pinheiro, Medeiros e Macedo (2001), demonstraram que na ausência (controle) e na presença de 10 g L⁻¹ de sacarose, foram observadas as maiores taxas de germinação. Nas concentrações acima desta faixa, ocorreu uma redução na porcentagem de sementes germinadas tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Lima et al. (2007) obtiveram melhor desenvolvimento de eixos embrionários de urucu em meio MS com concentração de 10 g L⁻¹. Tais constatações, provavelmente, devem-se ao fato de que a semente já possui em sua reserva nutritiva um teor de sacarose que lhe permita a emergência da plúmula e da raiz primária; adicionalmente, o excesso de sacarose colocado no meio extracelular pode ter provocado uma maior perda de água devido à pressão osmótica exercida sobre a semente (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977).

Segundo Khan (1978), o uso de compostos químicos biologicamente ativos, como reguladores de crescimento, pode cessar ou diminuir o impacto de fatores adversos na qualidade e desempenho das sementes.

As giberelinas estão diretamente envolvidas no processo germinativo das sementes e melhoram o desempenho das plântulas, acelerando a velocidade de emergência e realçando o potencial das sementes de várias espécies, embora em sementes de ingazeiro Stein et al. (2007) verificaram que não há necessidade de adicionar GA₃ na germinação *in vitro*. Aragão et al. (2003) verificaram que as sementes de milho armazenadas, que foram pré-embebidas em solução de 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico, apresentaram maior atividade metabólica e, assim, maior germinação e vigor, quando comparadas com a testemunha sem embebição em ácido giberélico. Leonel e Rodrigues (1996) trabalhando com sementes de limoeiro-cravo obtiveram maior germinação com o emprego de 50 mg L⁻¹ de GA₃ e, Bevilaqua et al. (1998) verificaram que sementes de cenoura tratadas com 100 mg L⁻¹ de GA₃ apresentaram maior vigor em relação àquelas

que não haviam sido tratadas. Nagão e Furutani (1986) também relataram um aumento de 50% na germinação de sementes de mamão papaya tratadas com GA₃.

Filner e Varner (1967) citado por Aragão et al. (2003) mostraram que a α -amilase é sintetizada em resposta ao ácido giberélico produzido pelo embrião e transferido para a camada de aleurona da célula, onde essa enzima é produzida via síntese novamente, promovendo a conversão do amido para açúcar, que é usado no crescimento da plântula. A alta degradação de proteínas de reserva associada à alta atividade de α -amilase proporciona aumento da germinação e vigor das plântulas.

Em relação ao vigor das plântulas, verificou-se que as massas fresca e seca não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos com imersão em GA₃ e sem imersão com GA₃ (Figuras 1B e 1C). Os meios de culturas suplementados com 15 e 30 mg L⁻¹ de sacarose proporcionaram a obtenção de plântulas mais vigorosas, com maior acúmulo de massa seca. Estes resultados corroboram as afirmações de que durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura podem não exercer efeito puramente nutritivo, mas exercem influência direta no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996); enquanto o efeito do GA₃ está relacionado à sua ação positiva na síntese da enzima α -amilase, responsável pelo desdobramento dos carboidratos na germinação (WILLIAMS; PETERSON, 1973), e os açúcares solúveis formados são responsáveis pela manutenção do crescimento das plântulas na fase de emergência. De acordo com George (1996), o crescimento e a organogênese *in vitro* estão diretamente relacionados com a interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), que são adicionados ao meio de cultura.

Conclusão

A imersão das sementes de beterraba em GA₃ proporciona maior porcentagem de germinação, nas concentrações de 15 e 30 mg L⁻¹ de sacarose no meio de cultura.

Os meios de culturas suplementados com 15 e 30 mg L⁻¹ de sacarose são os mais recomendados para externar o vigor das sementes, tanto para as imersas em GA₃ quanto as não imersas, não havendo relação significativa entre o aumento do metabolismo, proporcionado pelo tratamento com GA₃ e o vigor das plântulas.

Referências

ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; ALVES, E.; CATANEO, A. C. CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas, v. 25, n.1, p. 43-48, 2003.

ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 30-33, 1999.

BEVILAQUA, G. A. P.; PESKE, S. T.; SANTOS-FILHO, B. G.; SANTOS, D. S. B. Efeito do tratamento de sementes de cenoura com reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1271-1280, 1998.

COSTA, C. J.; VILLELA, F. A. Condicionamento osmótico de sementes de beterraba. *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 21-29, 2006.

CUNHA, R.; CASALI, V. W. D. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de alface. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 1, n. 2, p. 121-132, 1989.

DAYKIN, A.; SCOTT, I. M.; FRANCIS, D.; CAUSTON, D. R. Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internodes development. *Planta*, Springer Berlin / Heidelberg, v. 203, n. 4, p. 526-535, nov. 1997.

EIRA, M. T. S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alface I. Efeitos sobre a germinação. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 12, n. 1, p. 9-27, 1990.

EUCLYDES, R. F. *Manual de utilização do programa SAEG. Sistema para análise estatística e genética*. Viçosa: UFV, 1983, 59 p.

FILGUEIRA, F. A. R. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa, MG: UFV, 2000. 402 p.

FLETCHER, P. J.; FLETCHER, J. D. In vitro virus elimination in three Andean root crops: oca (*Oxalis tuberosa*), ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *New-Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Auckland, v. 29, n. 1, p. 23-27, 2001.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture*. Part 2: In Practice. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GEORGE, R. A. T. *Vegetable seed production*. 2. ed. Cambridge: University, 1999. 328 p.

GOMES, G. A. C. *Propagação in vitro de amoreira (Maclura tinctoria)*. 1999. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal) – Departamento de Agricultura. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HUTTLY, A. K.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin regulated plant genes. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 95, n. 2, p. 310-317, 1995.

KHAN, A. A.; PECK, N. H.; TAYLOR, A. G.; SAMIMY, C. Osmoconditioning of beet seeds to improve emergence and yield in cold soil. *Agronomy Journal*, Madison, v. 75, p. 788-794, 1983.

KHAN, A. A. Incorporation of bioactive chemicals into seeds to alleviate environmental stress. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 83, n. 2, p. 2255-2264, 1978.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J. D. Germinação de sementes de limoeiro cravo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1996. p. 167.

LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; MAIA, A. R. Germinação in vitro de urucu. *Revista Brasileira de Sementes*, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 171-177, 2007.

LOPES, J. C.; ZONTA, J. B.; CAVATTE, P. C. Efeito de diferentes tratamentos e substratos na germinação e desenvolvimento de plântulas de beterraba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 44., 2004, Campo Grande, MS. *Anais...* Campo Grande, MS: Sociedade Brasileira de Olericultura, 2004. v. 22. p. 1-04. 1 CD-ROM.

MCDONALD, M. D.; KHAN, A. A. Acid scarification and protein synthesis during seed germination. *Agronomy Journal*, Madison, v. 2, n. 75, p. 111-114, 1983.

- MINAMI, K. Biotecnologia e otimização da produtividade dos produtos hortícolas. In: CROCOMO, O. J.; MELO, M.; SHARP, W. R. (Ed.). *Biotecnologia para produção vegetal*. Piracicaba: ESALQ/USP: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 173-187.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGÃO, M. A.; FURUTANI, S. C. Improving germination of papaya seed by density separation, potassium nitrate, and gibberelic acid. *Hort Science*, Alexandria, v. 21, n. 6, p. 1439-1440, 1986.
- PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum uley*). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.
- PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N.; MACEDO, C. E. C. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamiento y aclimatación en condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton*, Argentina, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.
- SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.
- SOUZA, A. V. Propagação “*in vitro*” e aspectos anatômicos de *arnica Lychnophora pinaster* (Mart.). 2003. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. *Manual de sementes: tecnologia da produção*. São Paulo: Ceres, 1977. 224 p.
- WILLIAMS, J. F.; PETERSON, M. L. Relations between-amylase activity and growth of rice seedlings. *Crop Science*, Madison, v. 13, n. 6 p. 612-615, 1973.

