

Germinação *in vitro* de sementes de mogango (*Cucurbita pepo* L.) - Cucurbitaceae

André Luís Lopes da Silva¹, Dilson Antônio Bisognin²,
Cícero João Barriquello³, Carlos Evandro Leite Ritter³

¹*Biólogo, Bolsista do CNPq, Mestrando do PPG em Agronomia (UFSM)*

E-mail: biocloning@bol.com.br

²*Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Professor do Depto. de Fitotecnia da*

UFSM. E-mail: dilsonb@smail.ufsm.br

³*Acadêmicos do Curso de Agronomia da UFSM*

Resumo

O aumento da pressão osmótica reduz o estado de energia livre da água pelo aumento da concentração de solutos. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação *in vitro* de mogango (*Cucurbita pepo*). As sementes receberam o tratamento de desinfestação que consistiu de imersão em álcool 70% durante três min, três lavagens com água destilada e autoclavada, imersão em solução de 2,5% de NaOCl por 10, 20, 30 ou 40 min e três lavagens com água destilada e autoclavada. O meio de cultura foi constituído de água destilada e agar na proporção de 7 g L⁻¹, sendo o pH ajustado para 5,7. Foram testadas as concentrações de 0, 10, 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições de 10 sementes. Foram avaliadas a percentagem de germinação, a estimativa do dia médio de germinação, a energia germinativa de Baldwin e o índice de velocidade de germinação de sementes viáveis foram avaliados durante o período de germinação das sementes. Nas concentrações de 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose houve melhores índices de germinação. A redução da pressão osmótica não aumenta a percentagem de germinação *in vitro* de sementes de mogango.

Palavras-chave: Desinfestação de sementes, pressão osmótica

Abstract

An increase in osmotic pressure reduces the free energy of water through an increase in solute concentration. The objective of this study was to verify the effect of reduced osmotic pressure in *in vitro* germination of squash (*Cucurbita pepo*). Seed disinfection was done with by an immersion in alcohol 70% for three min, washing three times with sterile distilled water, immersion in a solution of NaOCl (2.5%) for 10, 20, 30 or 40 min, and washing three times with sterile distilled water. The culture medium was distilled water and agar (7 g L⁻¹), pH adjusted to 5.7. The concentrations of 0, 10, 20 or 30 g L⁻¹ of sucrose were used to increase osmotic pressure in the medium. A complete random design was used with five replications of 10 seeds. The germination index, average time for germination day, germination energy of Baldwin, and germination rate of viable seeds were evaluated. The osmotic pressure of 20 and 30 g L⁻¹ of sucrose in the culture medium showed the highest index of germination. The reduction of osmotic pressure do not increase the *in vitro* germination percentage of squash seeds.

Key words: seed disinfection, osmotic pressure.

Introdução

Diversos explantes podem ser usados para a propagação de uma planta *in vitro*, mas deve ser considerado o nível de diferenciação do tecido utilizado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Plântulas originadas de sementes possuem tecidos pouco diferenciados, o que possibilita uma ótima fonte de explantes competentes. No entanto, um alto percentual de germinação de sementes *in vitro* é necessário para possibilitar um suprimento suficiente de explantes para a realização de experimentos em cultura de tecidos.

As sementes de cucurbitáceas diferem quanto a forma de germinação *in vitro*. Nesta família de plantas existem espécies que germinam com a presença de tegumento, como *Cucumis sativus* (LOU et al., 1996) e *Cucumis melo* (JAAGRATI & MORE, 1992) e aquelas que necessitam da remoção do tegumento como são os casos de: *Lagenaria siceraria* (SILVA et al., 2004), *Momordica*

charantia (WANG et al., 2001) e *Citrullus lanatus* (COMPTON, 2000). Sementes inteiras (com tegumento) de *Lagenaria siceraria* necessitam de 43,4% de umidade para iniciar o processo de germinação (BISOGNIN et al., 1991) e sem o tegumento necessitam de apenas 30% de umidade (BISOGNIN & SILVA, 2004).

Em virtude da maior necessidade de água para a germinação, as sementes inteiras desta espécie poderiam germinar em meio de cultura, desde que a pressão osmótica fosse suficientemente reduzida para permitir um maior estado de energia livre da água, pois o aumento da concentração de solutos aumenta proporcionalmente a pressão osmótica e reduz o estado de energia livre da água. Desta forma, quanto maior a pressão osmótica menor será a disponibilidade de água para a embebição das sementes (TAIZ & ZEIGER, 2004). Numa menor pressão osmótica as sementes poderiam absorver maiores quantidades de água necessárias para a germinação, sem que fosse necessário retirar o tegumento, o qual funcionaria como uma barreira para a absorção de água pela semente sem tegumento (SILVA et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da redução da pressão osmótica na germinação *in vitro* de sementes de mogango.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Vegetal do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. As sementes utilizadas neste trabalho foram da cultivar "enrugado verde".

Desinfestação e germinação in vitro de sementes

As sementes foram imersas em álcool 70% durante 3 min e após lavadas três vezes com água destilada autoclavada, imersas novamente numa solução de NaOCl 2,5% durante 10, 20, 30 ou 40 min e lavadas três vezes em água destilada autoclavada. O meio de cultura utilizado para a germinação das sementes continha água destilada e 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo solidificado

com 7 g L⁻¹ de agar. Foram utilizados frascos com 1,8 cm de largura e 4,2 cm de comprimento, o volume do meio de cultura foi 3,5 ml. O pH foi ajustado para 5,7. Foram avaliadas as percentagens de desinfestação e germinação das sementes após 10 dias da semeadura.

Efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação in vitro

O meio de cultura utilizado para avaliar os efeitos da pressão osmótica sobre a germinação das sementes, foi constituído de água destilada, solidificado com 7 g L⁻¹ de agar com pH ajustado para 5,7 e suplementado com os tratamentos: 0, 10, 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. Foram avaliadas duas soluções comerciais de NaOCl (Cruzado[®] e Lavex[®]) contendo de 2 a 2,5% de cloro ativo. Foram avaliadas a percentagem de germinação, a estimativa do dia médio de germinação (EDMG), a energia germinativa de Baldwin (EGB) e o índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV) (BONOW, 1984). Foram realizadas análises volumétricas de oxi-redução para quantificar o teor de NaOCl nas soluções comerciais (Cruzado[®] e Lavex[®]) conforme o procedimento descrito por ADAD (1982).

A EDMG foi calculada pela seguinte fórmula:

$$EDMG = \sum Ni \cdot (1 / \sum Ni / Di)$$

Onde: N é o total de plântulas normais.

Para a energia germinativa de Baldwin (EGB), considera-se o valor máximo (VM), o qual é a germinação cumulativa dividida pelo número de dias desde o início do teste, ou seja a razão de $\sum Ni / Di$, onde o período de energia de Baldwin é a mais alta percentagem de germinação em relação ao tempo decorrido desde o início do experimento.

O índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV) é calculado pela seguinte fórmula:

$$IVGSV = 100 \cdot \left(\frac{\sum Ni}{Di} \cdot \frac{1}{\sum N} \right)$$

Onde: $\sum Ni$ é o somatório do número de plântulas normais no dia i; Di

é o dia de avaliação das plântulas, i varia de 1 até n .

Foram consideradas germinadas as sementes com o hipocótilo visível e de coloração verde e plântulas normais aquelas que expandiram os cotilédones. Cada experimento foi considerado concluído quando não ocorreu mais germinação em nenhum dos tratamentos.

Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo método de Bartlett e, posteriormente, a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Resultados e discussão

Desinfestação e germinação in vitro de sementes

No desenvolvimento de um protocolo de desinfestação para as sementes de mogango, a variável percentual de desinfestação, não demonstrou diferenças significativas, no entanto a variável percentual de germinação no tempo de 40 min. provocou uma redução no percentual de germinação, já os tempos de 10, 20 ou 30 min. não apresentaram diferenças significativas, porém determinamos o tempo de 20 min de imersão em solução de 2,5% de NaOCl (Tabela 1). Este tempo de imersão resultou na maior percentagem de germinação das sementes alcançando o índice de 36%, embora não significativo com os valores apresentados nos tratamentos com 10 ou 30 min. A redução do percentual de germinação das sementes com o aumento do tempo de imersão (40 min) pode estar associado ao efeito fitotóxico do cloro presente na solução. A redução do percentual de germinação das sementes em função do tempo de imersão em solução de 2,5% de NaOCl também foi observado em *Lagenaria siceraria*, outra espécie da família das cucurbitáceas (SILVA et al., 2004).

Efeito da redução da pressão osmótica sobre a germinação in vitro

As soluções comerciais Lavex[®] e Cruzado[®] produziram resultados diferentes sobre a germinação *in vitro* (Tabela 2). Ambas as soluções possuem

uma faixa de cloro ativo entre 2,0 a 2,5%, entretanto, as análises volumétricas das soluções utilizadas mostraram que o Cruzado[®] apresentou maior percentagem de cloro ativo (3,1%) do que o Lavex[®] (2,5%) o que justifica os efeitos mais drásticos sobre a germinação das sementes tratadas com a solução Cruzado[®], pois o cloro produz efeito fitotóxico (ANDRIOLO, 1999). Esta consideração é importante, pois na maioria dos protocolos de desinfestação de sementes, são citadas apenas a extensão da percentagem de cloro ativo e não fazem nenhuma referência quanto ao produto comercial, o que implica numa dificuldade para conseguir repetir os resultados. As concentrações de cloro ativo encontradas em água sanitária comercial variam de uma marca para outra e até na mesma marca (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Os procedimentos mais adequados nestes casos são quantificar o teor de cloro ativo da solução comercial de NaOCl ou usar produtos com grau reagente.

A redução da pressão osmótica pela diminuição da concentração de sacarose não foi eficaz para proporcionar altos índices de germinação das sementes como preconizado. A redução da pressão osmótica para as concentrações de 0 e 10 g.L⁻¹ de sacarose diminuiu a percentagem de germinação (Tabela 2). A fonte de cloro Cruzado nas concentrações de 0 e 10 g L⁻¹ de sacarose, inibiu a germinação das sementes em função da redução da pressão osmótica. Isto pode ter ocorrido devido ao maior suprimento de água e, concomitantemente, de cloro (3,1%). Porém na fonte de cloro Lavex, com 2,5% de cloro ativo não houve inibição da germinação, porém ocorreu uma redução significativa da germinação comparado com as concentrações mais elevadas de sacarose (20 e 30 g L⁻¹).

O cloro apesar de ser requerido pela planta para as reações fotossintéticas, as quais envolvem a evolução de O₂ (TAIZ & ZEIGER, 2004) além de ser muito solúvel, possui uma ação que inativa enzimas e age como oxidante (TRABULSI, 1991). Possivelmente, o tegumento de mogango possui substâncias inibidoras da germinação, que freqüentemente são compostos fenólicos, que ao se oxidarem geralmente limitam a disponibilidade de oxigênio para o embrião (BEWLEY & BLACK, 1994), inibindo a germinação.

As concentrações de sacarose de 20 e 30 g L⁻¹ não apresentaram

diferenças significativas quanto os percentuais de germinação *in vitro* de sementes, independente da fonte de cloro ativo. Quanto ao vigor das sementes, a redução da pressão osmótica não afetou a estimativa do dia médio de germinação e o índice de velocidade de germinação de sementes viáveis quando foi usado como fonte de cloro ativo o Lavex[®] (Tabela 2). Entretanto, a energia germinativa de Baldwin mostrou uma redução significativa do vigor nas concentrações de sacarose de 0 e 10 g L⁻¹. Quando foi usado o Cruzado[®] como fonte de cloro ativo, as avaliações de vigor foram significativamente menores e iguais a zero, como consequência da não germinação das sementes nas concentrações de 0 e 10 g L⁻¹ de sacarose.

Sementes inteiras de *Lagenaria siceraria* colocadas em meio de cultura com reduzida pressão osmótica (constituído de água destilada e solidificado com 1 g L⁻¹ de agar) não germinaram após 30 dias de cultivo (Dados não publicados). Este resultado está de acordo com os obtidos com mogango. Por outro lado, sementes de *Dyckia distachya* cultivadas em três concentrações de sais do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), apresentaram 40,8% de germinação em meio contendo 100% dos sais, 49,1% em meio contendo a metade dos sais e 55,8% de germinação em meio contendo um terço dos sais, ou seja, a redução da pressão osmótica promoveu um aumento da percentagem de germinação das sementes (POMPELLI, 2002). Essas diferenças de comportamento entre cucurbitáceas e bromeliáceas podem ser explicadas pelo tamanho das sementes, pois sementes grandes necessitam de maiores quantidades de água comparado com sementes pequenas. Neste caso, a pressão osmótica do meio de cultura possui uma limitada capacidade de aumentar a disponibilidade de água, podendo aumentar a taxa da germinação de sementes pequenas e ser desprezível para sementes grandes. As sementes de porongo apresentam 16 mm e as de mogango 17 mm de comprimento, comparadas com as de *D. distachya* que apresentam apenas 3 mm de comprimento.

Conclusão

A redução da pressão osmótica não aumenta o percentual de germinação *in vitro* de sementes de mogango.

Referências bibliográficas

- ADAD, J. M. T. **Controle químico de qualidade**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., 1982, 204p.
- ANDRIOLO, J. L. **Fisiologia das culturas protegidas**. 1. Ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 1999, 142p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. Ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BISOGNIN, D. A.; IRIGON, D. L.; MARTINAZZO, A. A. Teste de germinação em porongo - *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 459-167, 1991.
- BISOGNIN, D. A.; SILVA, A. L. L. **A cultura do Porongo**. Informe Técnico, Centro de Ciências Rurais (CCR - UFSM), n. 1, 2004.
- BONOW, R. N. **Estabelecimento de métodos de análise para a espécie trevo vesiculoso - *Trifolium vesiculosum* Savi**. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia de Sementes - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Pelotas, RS, 1984. 52 p.
- COMPTON, M. E. Interaction between explant size and cultivar affects shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. **HortScience**, v. 35, n. 4, p. 749-750, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.
- JAAGRATI, J.; MORE, T. A. In vitro regeneration in *Cucumis melo* cv. Pusa madhuras. **Cucurbit Genetics Cooperative Reports**, v. 15, p. 62-64, 1992.
- LOU, H.; OBARA-OKEYO, P.; TAMAKI, M. KAKI, S. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. **Journal of Horticultural Science**, v. 71, n. 3, p. 497-502, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- POMPELLI, M. F. **Morfogênese *in vitro*, Métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachia* Hassler**. 2002, 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Curso de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, A. L. L.; BISOGNIN, D. A.; RITTER, C. E. L.; BANDINELLI, M. G.; MÜLLER, D. R.; RAMPELOTTO, M. V. Propagação *in vitro* de porongo - *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. - Cucurbitaceae. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n. 2 - suplemento, p. 442, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

TRABULSI, L. R. Microbiologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 386 p.

WANG, S.; TANG, L; CHEN, F. *In vitro* flowering of bitter melon, **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 393-397, 2001.

Tabela 1. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogango cultivar "Enrugado Verde" (*Cucurbita pepo*) após 10 dias da sementeira. Santa Maria, RS, 2004

Imersão em NaOCl 2,5% (min)	Desinfestação (%)	Germinação (%)
10	84a ¹	24a
20	78a	36a
30	80a	22a
40	94a	8b

¹Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 2. Germinação e vigor, medidos pela estimativa do dia médio de germinação (EDMG), energia germinativa de Baldwin (EGB) e índice de velocidade de germinação de sementes viáveis (IVGSV), em sementes de mogango, cultivar "Enrugado Verde" em diferentes potenciais osmóticos *in vitro*. Santa Maria, RS, 2004

Sacarose (g.L ⁻¹)	Germinação (%)	EDMG	EGB	IVGSV
Solução comercial de NaOCl (2,5 % de cloro ativo) - Lavex [®]				
0	22b*	16,2a	0,53b	6,0a
10	18b	15,8a	0,49b	6,6a
20	32b	16,0a	0,75a	5,9a
30	34b	16,6a	0,73a	6,0a
Solução comercial de NaOCl (3,1 % de cloro ativo) - Cruzado [®]				
0	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
10	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
20	32,0a	17,2a	0,15a	5,8a
30	32,0a	15,5a	0,18a	6,3a

*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.