

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLANDIA

CENTRO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

CURSO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINAÇÃO DE MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO "IN VITRO" POR MEIO DE
GEMAS AXILARES DE LOURO (*Laurus nobilis* L.).

Alessandra Feijó Marcondes

MONOGRAFIA APRESENTADA A
COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE UBERLANDIA, PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE BACHAREL EM CIENCIAS
BIOLÓGICAS.

UBERLANDIA - MG

DEZEMBRO/1993

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINAÇÃO DE MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO "IN VITRO" POR MEIO DE
GEMAS AXILARES DE LOURO (*Laurus nobilis* L.).

Alessandra Feijó Marcondes

ORIENTADOR: Ivan Schiavini

MONOGRAFIA APRESENTADA A COORDENAÇÃO DO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA,
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO/1993

DETERMINAÇÃO DE MÉTODOS DE MICROPROPAGAÇÃO "IN VITRO" POR MEIO DE
GEMAS AXILARES DE LOURO (*Laurus nobilis* L.).

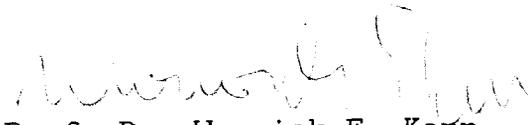
APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 13/01/94.


Prof. Dr. Ivan Schiavini

(Orientador)

Prof. Dra. Marli Ranal

(Conselheira)


Prof. Dr. Warwick E. Kerr

(Conselheiro)

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO/1993

OFERECIMENTO

Dedico este trabalho de modo muito especial (tão especial que somente eles entenderão), aos meus pais.

Ao meu pai, Oswaldo Marcondes, grande amigo, que me ensinou que a consciência dos nossos sonhos é um grande passo para a conquista dos mesmos, mas que o trabalho para realizá-los é o maior de todos.

A minha mãe, Wania Lucia, que além de tanto amor, deu-me também uma nova visão da vida e da família. "Você" é muito especial.

As minhas irmãs Ana Paula, Carmen Lúcia e Roberta que me desafiam na confirmação da teoria de que "o amor existe", e aos seus respectivos marido, noivo e namorado, adoro todos vocês.

Aos meus eternos e inesquecíveis amigos, Lucivane, André, Angela, Aldaí, Edwiges e Ivan. Que nossa saudade desafie nossos destinos e que nossa amizade realize o reencontro.

Ofereço também, a todos os meus amigos que de alguma forma compartilharam comigo um pouco de si e de alguma forma me engrandeceram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ivan Schiavini, pela amizade, confiança, orientação e pelos excessos de atenção e paciência.

Aos conselheiros, Profa. Dra. Marli A. Ranal e Prof. Dr. Warwick E. Kerr, pela compreensão, colaboração e amizade.

Ao amigo Luiz Augusto Matsucuma, pela co-orientação e pelo incentivo.

Ao amigo Lindomar, pela valiosa colaboração e troca de idéias.

A grande amiga Edna, pelo apoio e incentivo no momento certo. Gosto muito de você.

Aos queridos amigos Lucivane e André, pela ajuda e amizade.

Ao meu pai, pelo carinho e tempo a mim dispensados, durante a realização deste trabalho.

A Deus, por minha vida e por tantos amigos.

INDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISAO BIBLIOGRAFICA.....	4
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
III.1. Procedimentos Gerais.....	11
III.2. Procedimentos de Laboratório e Montagem do Experimento.....	14
III.3. Análise dos Dados.....	16
VI. RESULTADOS E DISCUSSAO.....	19
V. CONCLUSOES.....	30
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	31

RESUMO

Neste trabalho, por meio da cultura de meristemas, analisou-se o efeito de alguns reguladores de crescimento sobre gemas axilares de louro (*Laurus nobilis* L.), objetivando-se a determinação de um método adequado para sua micropropagação. O experimento foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Biociências, UFU, e constituiu-se de vinte tratamentos e cinco repetições. O meio utilizado foi o meio "MS", onde foram acrescidos diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA e BAP. A avaliação dos resultados obtidos, baseou-se em análises qualitativas e quantitativas dos mesmos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados. Avaliou-se o desenvolvimento dos explantes, a formação de calos e brotações dos mesmos. A interação entre os reguladores apresentou melhores resultados que os tratamentos isolados. A concentração mais indicada para novos experimentos é 0,01 e 1,0 mg/l de ANA e BAP respectivamente, uma vez que promoveu melhores resultados. No presente trabalho observou-se também, um alto índice de contaminação, o que confirma a necessidade de aperfeiçoamento do método de assepsia do material.

I. INTRODUÇÃO

O louro, *Laurus nobilis* L. (Lauraceae), comumente conhecido por loureiro, é uma árvore ou arbusto com folhas persistentes, originário da Ásia Menor e introduzido com sucesso no Mediterrâneo (von Hertwig, 1991).

As culturas comerciais de louro encontram-se na Argélia, Marrocos, Espanha, sul da França, Itália, Ilha de Chipre, Holanda, Bélgica, Portugal, Turquia, etc., onde são feitas em altitudes de até 1.200 metros (von Hertwig, 1991).

O louro é cultivado em regiões subtropicais das Américas, inclusive no Brasil, onde raríssimas vezes floresce e produz frutos.

As folhas do louro apresentam-se pecioladas, alternas, elípticas ou lanceoladas, coriáceas com bordos ondulados, inteiras, lisas, verde-escuras e brilhantes na página superior, verde-pálidas opacas na inferior, com 5 a 10 cm de comprimento. O caule é glabro de casca lisa e escura. As flores são pedunculadas, de cor amarela e, em geral, no verão dão lugar a um fruto em forma de baga oval como um azeitona, com cerca de

12 mm de diâmetro, que, quando maduro, adquire uma coloração negra-brilhante, contendo uma só semente (von Hertwig, 1991).

Temperaturas amenas, ou relativamente baixas, e dias longos (12 a 16 horas de luz) com boa distribuição pluviométrica, são condições ideais para a cultura.

É uma espécie aromática e medicinal, com utilização adicional em medicina veterinária. Para fins aromáticos, utilizam-se principalmente as folhas dessecadas, sem os pecíolos. O óleo essencial extraído dos frutos, encontra pouca aplicação na aromatização dos alimentos e na medicina humana. Na veterinária, porém, a manteiga ou o óleo, são usados como parasiticida. Industrialmente, a manteiga ou o óleo de louro são usados na fabricação de sabões e velas, e, também, na perfumaria (von Hertwig, 1991).

Segundo GIACOMETTI (1989), no Brasil a variabilidade genética para características agronômicas desejáveis é quase inexistente, uma vez que aqui a espécie é sempre propagada vegetativamente por alporquia, estacas com folhas ou rebentões.

Atualmente, o Brasil importa um grande volume de plantas aromáticas e medicinais, e considerável parte dessas plantas poderia ser produzida no País, considerando as diferentes altitudes e latitudes deste território. A outra parte, porém, desse total importado, não encontra condições ambientais para o

seu desenvolvimento. Deste modo, por meio de um trabalho de seleção genética de plantas que se adaptem às condições de nosso País, é que talvez se possa inverter tal situação.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para micropropagação "in vitro" de louro, *Laurus nobilis* L. (Lauraceae), analisando o efeito de alguns reguladores de crescimento na indução de brotação e formação de raízes a partir de gemas apicais e axilares.

II. REVISAO BIBLIOGRAFICA

A cultura de tecidos nada mais é do que o isolamento de células, fragmentos de órgãos e tecidos de uma determinada planta e o cultivo destes em um meio artificial, previamente esterilizado, que contém basicamente sais minerais, vitaminas, açúcar como fonte de energia, e, reguladores de crescimento (PETERS, 1990).

O cultivo de ápices caulinares e/ou meristemas tem sido usado com o objetivo de superar o problema de contaminação patogênica de propágulos, tendo êxito em programas para propagação e multiplicação de material sadio, além de auxiliar o intercâmbio e o melhoramento genético (CRISP & WALKEY, 1974; SOUZA, 1988; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A tecnologia da cultura de tecidos poderá ser utilizada não apenas na preservação e melhoramento de variedades ou cultivares já existentes, como também na obtenção de novos genótipos.

Além disto, esse sistema tem inúmeras vantagens:

1. Reduz o tempo e a quantidade de material vegetal para propagar novas espécies;

2. é mais preciso, porque as condições nutricionais e ambientais podem ser facilmente controladas;

3. é mais seguro que os métodos tradicionais de propagação vegetativa, a partir do momento que permite descartar os tecidos afetados por viroses e curar facilmente (por termoterapia) as plantas que estiverem afetadas;

4. dentro dos vidros de cultura esterilizados, nenhuma infecção externa pode afetar a multiplicação das plântulas (JONA, 1987).

Tem-se, ainda, a manutenção do genótipo e do fenótipo de híbridos, mutações ou variantes genéticas selecionadas (GIACOMETTI, 1990).

A metodologia para propagação a partir de meristemas depende de maneira geral, como em todo processo de micropropagação, da assepsia, do genótipo do material, do explante em si, e da composição do meio de cultura em que este vai ser inoculado (QUEIROZ LUZ, 1993). O tamanho do explante é de

suma importância para o sucesso da operação (KARTHA, 1981, citado por PETERS, 1990). Normalmente são utilizados meristemas apicais e/ou axilares medindo 0,2 a 0,5 mm de comprimento, dependendo da espécie, contendo no máximo um par de folhas primordiais (PETERS, 1990).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), as substâncias com ação germicida mais comumente utilizadas para assepsia de explantes são o etanol e os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio, onde algumas gotas de detergente (Tween 20 em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v)) são adicionadas para melhorar o contato destas com os tecidos. Estes mesmos autores recomendam a utilização do etanol a uma concentração de 70 a 80%, uma vez que, acima disto, é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos, sendo também recomendável um tempo curto de exposição do material.

A composição do meio nutritivo é um importante parâmetro que deve ser otimizado para que a regeneração da planta seja bem sucedida. Deve ser composto de sais, fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento.

A adição de fitorreguladores ao meio, tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz; simultaneamente, a adição de fitorreguladores estimula certa resposta como

crescimento e alongamento ou multiplicação da parte aérea. Esta resposta depende do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano e estado geral da planta-matriz (ALTMAN & GOREN, 1977, citado por GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Segundo QUEIROZ LUZ (1993), SKOOG & MILLER (1957) citam o diagrama, no qual, de acordo com a relação auxina/citocinina, ocorrem diferentes respostas; sendo intermediária, a tendência é a formação de calos, quando é elevada, ocorre enraizamento, e, do contrário, tem-se a formação e o crescimento de parte aérea. Nem sempre, no entanto, os resultados obedecem tipicamente esta relação.

De acordo com SKOOG & MILLER, 1957, citado por CALDAS et al. (1990), as auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos.

Segundo MATSUCUMA (1993), a utilização de sacarose como fonte de energia é recomendada por ser mais rapidamente absorvida.

Concentrações de 2 a 4% p/v são as mais comuns uma vez que concentrações mais baixas podem provocar clorose generalizada da cultura e, com concentrações mais altas, pode-se incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico do meio, que pode levar a uma deterioração das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Segundo os mesmos autores, o estado físico do meio também influencia o desenvolvimento dos explantes, sendo que em meios sólidos ou semi-sólidos a concentração de ágar utilizada vai de 0,45 a 0,8%, dependendo da marca, do ágar. Este é responsável, também, pela alteração da disponibilidade de água, nutrientes e fitorreguladores, podendo modificar a composição química do meio, conforme os teores de impurezas.

Outro fator a considerar é o pH do meio, que, segundo PASQUAL et al. (1992), sofre variações promovidas pela autoclavagem e aquecimento, e considera, também, esta variação como função da concentração de ágar e do pH inicial.

As liberações químicas prejudiciais ao explante, geralmente referentes ao seu escurecimento, podem usualmente ser combatidas através de reculturas frequentes, ou inclusão de carvão ativado, no meio.

O carvão ativado tem duas funções:

1. Escurece o meio, impedindo a incidência de luz na base do explante, reduzindo a oxidação;
2. absorve os compostos tóxicos presentes no ágar (KOHLENBACK & WERNICKE, 1978, citado por GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), ou formados durante a oxidação dos

compostos fenólicos (FRIDBORG et al., 1978, citado por GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Segundo HANDRO & FLOH (1990), a sala de crescimento do material inoculado deve apresentar condições controladas de iluminação, para que o fotoperíodo seja constante o ano inteiro (recomendam 16 horas/dia) e também controle de temperatura e umidade, sendo importante que a temperatura se mantenha a 26 + ou -10C, podendo variar entre 20 e 30 0C sem causar danos.

Plantas regeneradas de culturas de ápices caulinares podem, ocasionalmente, apresentar variações (BUSH et al., 1976; DENTON et al., 1977; citado por ILLG, 1990). Contudo, a maioria dos trabalhos com culturas de meristemas demonstrou a manutenção da identidade e estabilidade genética das plantas regeneradas por este sistema (MURASHIGE, 1974; D'AMATO, 1975, citado por ILLG, 1990).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), um método recomendável para impedir a variação somaclonal é a execução constante de novos isolamentos.

Concluído o desenvolvimento da planta, segue-se a fase de aclimação que, de acordo com GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), é uma fase bastante crítica e representa em alguns casos um fator limitante do processo de micropropagação.

Segundo SENNA NETO, 1990, citado por QUEIROZ LUZ, 1993, na aclimação podem acontecer insucessos que estão relacionados à elevada taxa de transpiração; à passagem da condição heterotrófica para autotrófica; à perda da condição de alta disponibilidade de nutrientes, necessitando incrementar sua absorção, e perda do ambiente asséptico.

Assim, a regra geral para tal fase é a manutenção de alta umidade e temperatura amena, uma vez que existem poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplante e aclimação.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos vegetais, do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - Minas Gerais, no período de julho a dezembro de 1993.

III.1. Procedimentos Gerais

Os galhos fornecedores dos explantes foram selecionados quanto à idade, sanidade e tamanho.

Utilizou-se basicamente o meio MS (Tabela 1), acrescido com reguladores de crescimento e algumas modificações (Tabela 2).

A auxina ANA, ácido naftalenoacético, e a citocinina BAP-6-Benzilaminopurina foram diluídas em NaOH 1,0 N para a preparação da solução estoque, que foi armazenada em geladeira a

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO BÁSICO - MS - MURASHIGE & SKOOG (1962)

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO DO MEIO (mg/l)
1. SAIS MINERAIS	
1.1 - MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	1.650,000
HNO ₃	1.900,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
1.2 - MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ .H ₂ O	22,300
H ₃ BO ₃	6,200
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,600
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
2. VITAMINAS	
GLICINA	2,000
ACIDO NICOTINICO	0,500
PIRIDOXINA HCl	0,500
TIAMINA HCl	0,100
3. FeEDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800
Na ₂ EDTA	37,300
4. SACAROSE	30.000,000
5. INOSITOL	100,000

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO BÁSICO - MS - MURASHIGE & SKOOG (1962)
(COM MODIFICAÇÕES)

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO DO MEIO (mg/l)
1. SAIS MINERAIS	
1.1 - MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	412,500 (*)
HNO ₃	475,000 (*)
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000
1.2 - MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ .H ₂ O	22,300
H ₃ BO ₃	6,200
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,600
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
2. VITAMINAS	
GLICINA	2,000
ACIDO NICOTINICO	0,500
PIRIDOXINA HCl	0,500
TIAMINA HCl	0,100
3. FeEDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800
Na ₂ EDTA	37,300
4. SACAROSE	15.000,000 (*)
5. INOSITOL	100,000

(*) - MODIFICADO

40°C. Portanto, estes reguladores foram adicionados ao meio de cultura no final do preparo.

O pH do meio de cultura foi ajustado, com NaOH ou HCl, para o valor de 5,7, mais ou menos 0,1, antes da adição do ágar para a solidificação do meio.

Foram utilizados frascos de 200 ml que, após a adição do meio de cultura, foram vedados com dupla folha de alumínio e película de PVC, numerados, autoclavados a 1,5 ATM e 120°C, por vinte minutos e mantidos em local protegido de luz.

A assepsia da sala onde foram conduzidos os experimentos foi feita com a utilização de formol, álcool 70%, luz ultravioleta e câmara de fluxo laminar horizontal.

Após a inoculação dos explantes, nos frascos contendo 20 ml de meio, estes foram vedados com película de PVC e mantidos por cinco dias em local protegido de luz. Posteriormente, foram conduzidos e mantidos em salas de crescimento com temperatura oscilando entre 22 e 27°C e fotoperíodo de 16 horas de luz (luz branca fria).

III.2. Procedimentos de laboratório e montagem do experimento

Os galhos foram coletados e tratados, ainda em campo, com uma colher de sopa de hipoclorito de sódio, dentro de um saco

plástico, para evitar a proliferação de microorganismos superficiais.

Em laboratório o material foi lavado em água corrente, em solução de hipoclorito a 2% e, enxaguado em água destilada.

Deste material, foram isolados segmentos caulinares, contendo de uma a três gemas, que foram lavados em uma solução de Tween 20 a 2%, utilizando uma escova macia e enxaguados com água destilada.

A desinfestação dos segmentos consistiu na imersão rápida (1 minuto) em álcool 70, seguida por imersão em solução de Tween 20 a 2% (5 minutos) e também por imersão em hipoclorito de sódio 1% ou água sanitária comercial a 20%, por vinte minutos. As imersões foram feitas sob agitação, promovida por um agitador magnético. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, o material foi lavado três vezes em água destilada estéril, e permaneceu em repouso em solução de ácido ascórbico a uma concentração de 150 mg por litro.

Os meristemas, de aproximadamente 1,0 mm, foram isolados sobre placa de Petri, contendo papel de filtro, tendo o auxílio de uma lupa binocular, pinças e bisturis cirúrgicos. Este material utilizado na remoção dos meristemas foi previamente autoclavado e, durante o isolamento, foi constantemente flambado.

Após o isolamento dos meristemas estes foram imediatamente inoculados nos frascos contendo o meio MS modificado, e acrescido dos reguladores de crescimento ANA nas concentrações 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l, combinado com BAP em 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l, perfazendo um total de vinte tratamentos (Tabela 3).

As modificações do meio consistem na redução em 50% da concentração original de sacarose e em 75% da concentração original dos macronutrientes (NH_4NO_3 - Nitrato de Amônia e KNO_3 - Nitrato de Potássio). Assim, foram acrescidos ao meio 15,0 g/l de sacarose, 0,7% de ágar e 0,2% de carvão ativado.

O material foi avaliado 40 dias após a inoculação, verificando-se a organogênese direta do explante (brotos) e indireta via formação de calos.

A metodologia utilizada baseou-se nos métodos descritos por SANTOS (1986) e TORRES & CALDAS (1990).

Foi realizado o experimento descrito, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições e um explante por repetição.

III.3. Análise dos dados

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO (mg/l) DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO
E NUMERAÇÃO DOS TRATAMENTOS REALIZADOS

A N A	B A P				
	0,00	0,20	0,50	1,00	2,00
0,00	1	2	3	4	5
0,01	6	7	8	9	10
0,10	11	12	13	14	15
1,00	16	17	18	19	20

O percentual de desenvolvimento dos explantes foi estimado baseando-se no tamanho com que o meristema foi inoculado, e estipulando-se um valor de crescimento considerável, acima do valor inicial.

O percentual referente à formação de calos foi estimado baseando-se no número máximo de calos formados por explante, no período de 40 dias.

Com relação à formação de brotações, o percentual foi estimado baseando-se na formação ou não das mesmas, no período de 40 dias, entre as cinco repetições de cada tratamento.

Foi usada a Análise de Variância para identificar diferenças significativas entre os tratamentos, através do Teste F de Snedecor. Detectando-se diferenças significativas, utilizou-se o teste estatístico de Tukey a 5% para tentar-se identificar em que tratamentos ocorreram diferenças. Para os dados referentes à produção de calos, sendo que as respectivas percentagens foram transformadas para raiz quadrada ($X + 0,5$).

IV. RESULTADOS E DISCUSSAO

O método de desinfestação do material apresentou 29% de eficiência, ou seja, não se mostrou propriamente eficiente. Os principais agentes contaminantes foram bactérias e fungos, sendo as primeiras responsáveis por mais de 80% das contaminações. A proporção de contaminações nos explantes é quase 4,5 vezes maior do que as contaminações no meio, e representam 82% do total (Tabela 4).

Este alto índice de contaminação pode ter ocorrido em função do material ser originalmente proveniente do campo e ter sido coletado em período chuvoso, uma vez que, segundo LOPES (1989), espécies de plantas arbóreas ou arbustivas, em comparação às plantas de ciclo curto, normalmente são mais sujeitas à contaminação, pelo fato de estarem maior tempo expostas aos contaminantes ambientais; e, em relação às condições ambientais, sabe-se que as contaminações são mais frequentes em regiões de clima tropical, uma vez que as bactérias se multiplicam com mais rapidez sob altas temperatura e umidade.

TABELA 4 - REPRESENTAÇÃO QUALITATIVA DO ÍNDICE DE CONTAMINAÇÃO OBSERVADA NO CULTIVO "IN VITRO" DE MERISTEMAS DE LOURO, NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, AOS 5 E 40 DIAS APOS A INOCULAÇÃO.

TRATAMENTOS E REPETIÇÕES	CONTAMINAÇÃO		
	NENHUMA	DO MEIO	DO MERISTEMA
1	*		B/B/B/B
2		F-B	B/B/B/B
3		F	B/B/B/B
4	***		B/B
5	*		F/B/B/B
6	****		B
7	**	F	B/B
8	*	F	B/B/B
9	***		B/B
10	**		B/B/B
11	*	F	B/B/B
12	***	F/F	
13	*	F	B/B/B
14	*		F/B/B/B
15	*	F	B/B/B
16	*	F	B/B/B
17	*	F	B/B/B
18	*	F	B/B/B
19	**		B/B/B
20		B	B/B/B/B
TOTAL	29	13	58

B - CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

F - CONTAMINAÇÃO FUNGICA

Ainda de acordo com LOPES (1989), existem dois tipos de contaminação observadas em culturas de tecidos, e são elas: a contaminação do meio e a contaminação da plântula "in vitro". A contaminação do meio de cultura é proveniente de pinças e lâminas não devidamente esterilizadas (algumas bactérias podem resistir à flambagem por até 3 segundos), filtros velhos ou contaminados, tecido vegetal infestado ou infectado, ambiente contaminado ou meio de cultura não esterilizado. Quanto à contaminação do explante, o tecido vegetal pode estar infestado (contaminação externa) ou infectado (contaminação interna), é proveniente da esterilização incompleta do mesmo.

Portanto, o alto índice de contaminação pode ser consequência de erros metodológicos ou processos ineficientes de assepsia do material.

O processo de oxidação fenólica foi bastante significativo alcançando o índice de 25%, como pode ser visto na Tabela 5. Este problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, uma vez que os tecidos destas espécies são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. De acordo com KERR (1) este problema tem sido observado com maior intensidade em espécies da Família Lauraceae.

(1) KERR, W. E. (Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Biociências, Uberlândia. Comunicação Pessoal).

TABELA 5 - REPRESENTAÇÃO QUALITATIVA DO ÍNDICE DE OXIDAÇÃO OBSERVADA NO CULTIVO 'IN VITRO' DE MERISTEMAS DE LOURO, NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, AOS 40 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO

TRATAMENTO E REPETIÇÕES	O X I D A Ç A O			NENHUMA
	TOTAL	BASE-EXPLANTE	APICE-EXPLANTE	
1	-	1	-	4
2	-	-	-	5
3	-	1	-	4
4	-	2	1	2
5	-	-	-	5
6	-	1	2	2
7	-	-	-	5
8	-	-	-	5
9	-	1	-	4
10	-	1	-	4
11	-	2	-	3
12	-	1	-	4
13	1	-	-	4
14	1	-	-	4
15	1	1	-	3
16	-	1	-	4
17	-	2	-	3
18	-	1	-	4
19	2	1	-	2
20	1	-	-	4
TOTAL	6	16	3	75

De acordo com a lista de possibilidades técnicas para reduzir a oxidação fenólica, sugerida por GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), muitos passos foram adotados na metodologia descrita, sendo eles: lavagem dos explantes em água corrente, utilização de substâncias antioxidantes como ácido ascórbico e carvão ativado e incubação inicial dos explantes no escuro. Ainda de acordo com estes autores, talvez fosse mais eficiente a utilização de ácido ascórbico incluído no meio, a utilização de meio básico mais diluído e transferência frequente dos explantes, sendo que este último evitaria a difusão dos produtos tóxicos da oxidação no meio.

O pouco desenvolvimento dos meristemas ocorreu de maneira geral, sendo que aos 40 dias o crescimento máximo observado foi de 7 mm. Não houve formação de raízes nem tampouco a formação de folíolos. Houve sim o crescimento (alongamento) do explante, formação de calos e pequenas brotações.

Considerando-se que o desenvolvimento máximo atingido pelos explantes, em 40 dias, foi de apenas 7 mm, estipulou-se um valor mínimo (3 mm), acima do qual foi estimado o percentual de desenvolvimento dos explantes.

De acordo com a Figura 1, dos tratamentos realizados com apenas um regulador de crescimento (ou ANA ou BAP), todos os que continham apenas citocinina estão ali representados, o que concorda com (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977, citado por GRATTAPAGLIA &

MACHADO, 1990), que afirmam nem sempre as auxinas serem necessárias no meio de multiplicação. Dos tratamentos realizados em combinação de ANA e BAP, conforme a Figura 1, a concentração que permitiu o percentual máximo de desenvolvimento do explante foi 0,01 mg/l de ANA e 1,0 mg/l de BAP, caracterizando talvez a proporção mais apropriada destes reguladores.

As concentrações de auxina foram frequentemente baixas se comparadas às de citocinina para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1, uma vez que, segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calo em detrimento da multiplicação.

Considerando-se a formação de calos, a análise de variância mostrou efeito significativo, a nível de 5% de probabilidade, para a interação entre os reguladores de crescimento ANA e BAP (Tabela 6). Considerando-se também que o número máximo de calos formados, em 40 dias, por explante, foi quatro, a estimativa do percentual de formação de calos baseou-se na seguinte relação: em condições ideais todos os explantes formariam quatro calos, como cada tratamento constituiu-se de cinco repetições, cada uma contendo um único explante, seria de se esperar que cada tratamento apresentasse a formação de vinte calos, representando, portanto, 100% de formação (Figura 2).

TABELA 6 - SINOPSE DOS RESULTADOS OBSERVADOS NO CULTIVO "IN VITRO" DE MERISTEMAS DE LOURO, NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, AOS 40 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO

TRATAMENTOS	DESENVOLVIMENTO DE EXPLANTES $\geq 3\text{mm}$	FORMAÇÃO DE CALOS				FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES
		(%)	(%)	MEDIA	ERRO (+ OU -)	DADO TRANSFORMADO EM $Vx+0,5$
0,00 + 0,0	40	10	0,40	0,24	0,5440	-
0,00 + 0,2	20	10	0,40	0,40	0,4852	-
0,00 + 0,5	40	45	1,60	0,73	1,2064	-
0,00 + 1,0	20	10	0,40	0,24	0,5440	-
0,00 + 2,0	40	20	0,80	0,48	0,7088	-
0,01 + 0,0	0	25	1,00	0,32	0,9459	-
0,01 + 0,2	40	20	0,80	0,37	0,7857	-
0,01 + 0,5	20	15	0,80	0,40	0,8255	+
0,01 + 1,0	20	35	1,40	0,40	1,1087	+
0,01 + 2,0	0	50	2,00	0,63	1,3063	-
0,10 + 0,0	60	25	1,00	0,32	0,9459	-
0,10 + 0,2	40	10	0,40	0,24	0,5440	-
0,10 + 0,5	20	15	0,80	0,80	0,5282	-
0,10 + 1,0	0	15	0,60	0,60	0,5262	-
0,10 + 2,0	0	5	0,20	0,20	0,3638	-
1,00 + 0,0	0	10	0,40	0,24	0,5440	-
1,00 + 0,2	20	15	0,60	0,24	0,7043	-
1,00 + 0,5	20	0	0,00	0,00	0,2238	-
1,00 + 1,0	0	10	0,40	0,40	0,4852	-
1,00 + 2,0	0	0	0,00	0,00	0,2238	-
F					1,73*	
G.L.					19,60	
Q.V.					78,61	

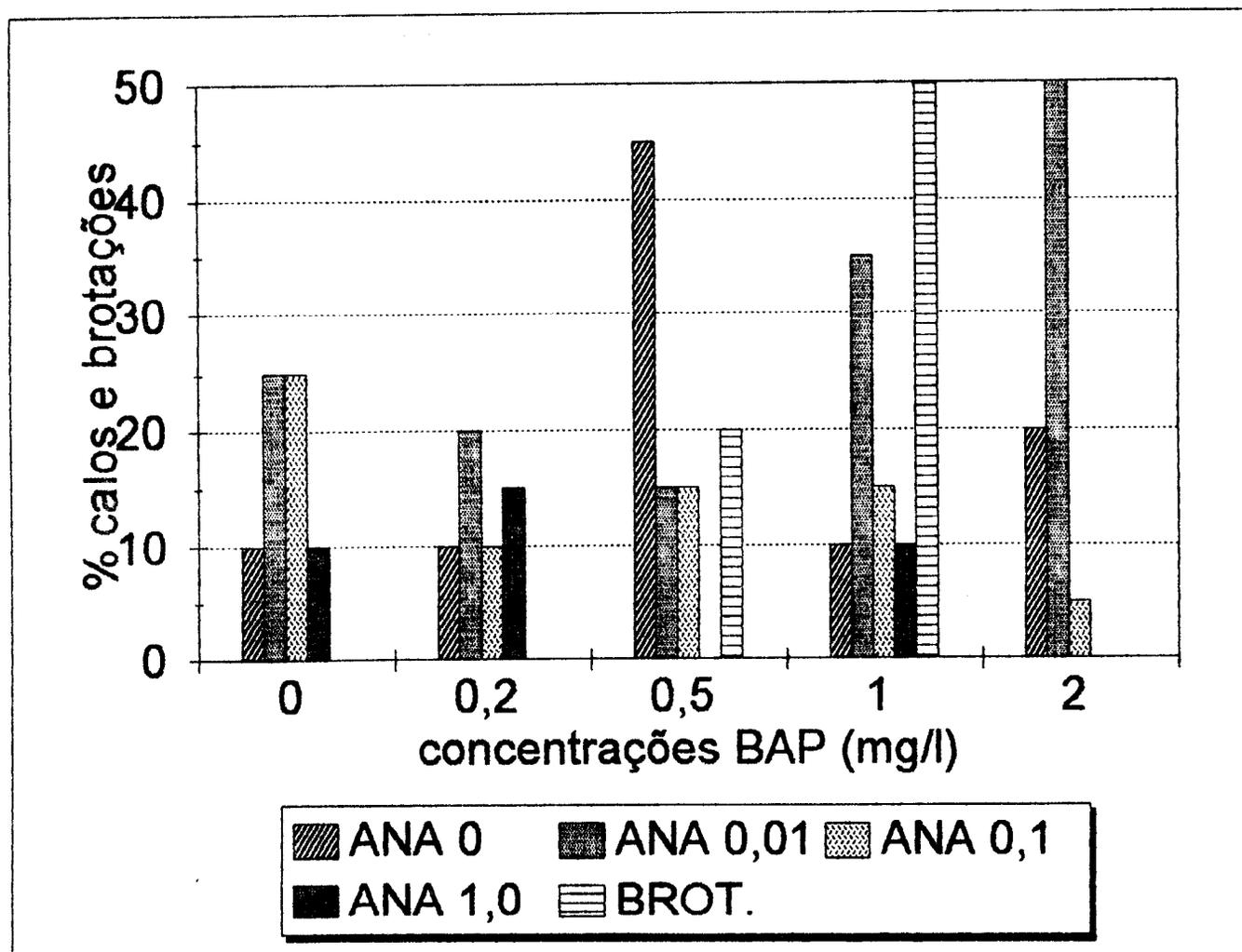


FIGURA 2. Efeito de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) na formação de calos e brotações a partir de meristemas de louro (*Laurus nobilis*).

Quanto à formação de brotações, no período de 40 dias, considerou-se a formação ou não das mesmas em cada uma das cinco repetições de cada tratamento. Assim, a formação de brotações em todas as repetições corresponderiam a 100% de formação (Figura 2).

Nota-se o reduzido número de brotações, que só foram observados em dois tratamentos. Estas brotações partiram dos calos, caracterizando, assim, calos organogênicos, que, segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), não são desejáveis nesta fase de estabelecimento da cultura "in vitro", por possibilitarem o surgimento de variação somaclonal.

Talvez estes resultados sejam consequência de uma alta concentração de BAP, o que estaria de acordo com QI-GUANG et al., 1986, citado por GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990, que observaram que o excesso de BAP inibiu a brotação de gemas, reduziu drasticamente o número de partes aéreas por explante e promoveu a formação de calo em culturas de *Castanea molissima*.

Ainda de acordo com a Tabela 6, as concentrações de 0,01 + 1,0 e 0,1 + 0,0 mg/l de ANA e BAP, respectivamente, foram as que mais favoreceram o desenvolvimento dos meristemas. Quanto à formação de calos, as concentrações de 0,0 + 0,5; 0,01 + 1,0 e 0,01 + 2,0 mg/l de ANA e BAP, respectivamente, propiciaram a formação do maior número médio de calos. A formação de brotações foi observada nos tratamentos com 0,01 mg/l de ANA,

combinados com 0,5 e 1,0 mg/l de BAP.

Sobrepondo-se tais resultados, observa-se que o meio mais propício para o desenvolvimento do explante, formação de calos e formação de brotações foi aquele cujas concentrações são: 0,01 mg/l de ANA combinados com 1,0 mg/l de BAP.

Esta, talvez, fosse a concentração mais indicada para novos experimentos, apesar de o teste de Tukey (5%) não diferir os diversos tratamentos.

O baixo número de repetições dificultou a análise estatística do experimento, o que levou a uma análise qualitativa do mesmo.

Fazendo-se uma análise mais geral do experimento, constatou-se alguns erros metodológicos que poderiam explicar o baixo índice de regeneração dos explantes. Alguns destes erros seriam, segundo CALDAS (2), a utilização de frascos muito grandes, se comparados com o tamanho do material inoculado, o que ocasiona uma menor efusão de etileno para fora do tubo e impede o crescimento das folhas; utilização de meio muito sólido, que impede que ocorra maior difusão do material ou compostos do explante para o meio e vice-versa e também utilização de grande volume de meio.

(2) CALDAS, L. S. (Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Brasília. Comunicação Pessoal).

V. CONCLUSOES

A - O índice de contaminação do material foi bastante elevado. As contaminações foram muito mais frequentes nos explantes do que no meio, sugerindo, assim, um aperfeiçoamento da técnica de assepsia.

B - O nível de desenvolvimento dos explantes foi baixo, sendo que a combinação 0,01 e 1,0 mg/l de ANA e BAP, respectivamente, promoveram o percentual máximo de crescimento.

C - Também a concentração 0,01 e 1,0 mg/l de ANA e BAP, respectivamente, promoveu a formação de calos organogênicos, sendo que nesta mesma combinação e na combinação com 0,5 mg/l de BAP, ocorreu o desenvolvimento de brotações provenientes destes calos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos.

In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPB, 1990. 433 p. p. 37-70.

GIACOMETTI, D. C. Ervas Condimentares e Especiarias. São Paulo, Nobel, 1989.

GIACOMETTI, D. C. Impacto Atual da Cultura de Tecidos de Plantas.

In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPB, 1990. 433 p. p. 19-25.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPB, 1990. 433 p. p. 99-169.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. A Organização de um Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPB. 1990. 433 p. p. 29-36.

ILLG, R. D. Variação Somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas.

Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433p. p.287-295.

JONA, R. Tissue Culture of Selected Tropical Fruit Plants. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1987. 123p.

LOPES, c. A. Contaminações Bacterianas em Cultura de Tecidos. ABCTP Notícias, Brasília No.13. p.2-4, dez. 1989.

MATSUCUMA, L. A. Micropropagação de Abiu (*Pouteria caimito* L.) por Meio de Gemas Axilares "in vitro". Uberlândia, 1993. 24p. Monografia apresentada para obtenção do Grau de Engenheiro Agrônomo.

PASQUAL, M.; BARROS, I. Variação do pH do meio "MS" de Cultura "in vitro" como função da concentração de ágar e do pH inicial. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 27(11): 1513-1517, Nov. 1992.

PETERS, J. A. Cultura de Tecidos de Plantas. In: SEMINARIO SOBRE PERSPECTIVAS DA BIOTECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO VEGETAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 1988. Perspectivas da Biotecnologia para a Produção Vegetal do Rio Grande do Sul. Passo Fundo, Universidade de Passo Fundo, 1990. 61p. p.16-24.

QUEIROZ LUZ, J. M. Obtenção "in vitro" de Plantas de Mandioquinha Salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) via Cultura de Meristemas. Lavras, 1993. 52p. (Tese de Mestrado - Escola

Superior de Agricultura de Lavras).

SANTOS, M. A. Determinação de Métodos para Introdução, Multiplicação e Conservação "in vitro" de Plantas Medicinais. Brasília, 1986. Trabalho final para o Estágio Supervisionado. Engenharia Agrônômica. Fundação Universidade de Brasília.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Histórico da Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p. p.15-18.

von HERTWIG, I. F. Plantas Aromáticas e Medicinais: Plantio, Colheita, Secagem, Comercialização. 2a. Ed., São Paulo, Icone, 1991.