

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

**MICROPROPAGAÇÃO DE ABIU (*Pouteria caimito*) EM MEIO  
"MS" MODIFICADO**

FREDERICO WITIER MAZZONETTO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG

Março-1999

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

**MICROPROPAGAÇÃO DE ABIU (*Pouteria caimito*) EM MEIO  
"MS" MODIFICADO**

FREDERICO WITIER MAZZONETTO

Orientador: PROF. DR. WARWICK ESTEVAM KERR

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG

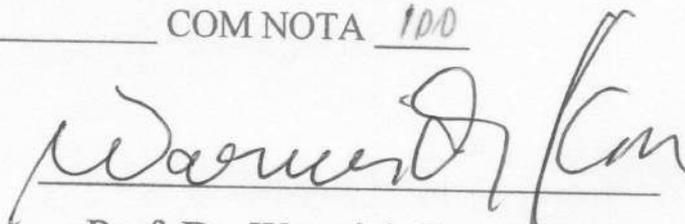
Março-1999

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

MICROPROPAGAÇÃO DE ABIU (*Pouteria caimito*) EM MEIO  
"MS" MODIFICADO

FREDERICO WITIER MAZZONETTO

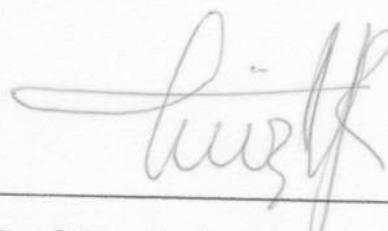
A BANCA EXAMINADORA REUNIDA EM 04/03/99 CONSIDEROU  
ESTA MONOGRAFIA \_\_\_\_\_ COM NOTA 100



Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

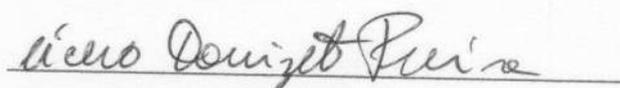
Orientador

*Ana Maria Coelho*  
Universidade Federal de Uberlândia  
Centro de Ciências Biomédicas  
Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Coelho Carvalho  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Co-orientador



Eng. Agr. Cícero Dozinete Pereira

Co-orientador

"O homem é pacífico por natureza.  
Existem animais, como o tigre e o leão,  
que devem matar para sobreviver.  
A natureza lhes deu presas e garras.  
Mas o homem não tem presas e garras.  
Para sobreviver ele precisa de ar,  
de água e de comida, mas sobretudo  
da amizade dos próprios semelhantes.  
Todos devemos compreender que quem não  
sorri aos outros não pode pretender  
que os outros lhe sorriam, e que a verdadeira  
amizade se conquista com a simplicidade e  
a generosidade do coração."

Dalai Lama

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades que tive e por tudo o que aprendi.

Aos meus pais, José e **DEDICATÓRIA** Mary de suas vidas uma luta constante para a educação dos filhos.

A minha irmã Daniela, que sempre me incentivou nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Alexandre, que apesar de distante, de alguma forma me ajudou.

Ao professor Dr. Warwick Estevam Kerr, pela paciência e dedicação em infatigáveis trabalhos aos sábados.

Ao professor Dr. José Magno Queiruz Luz, por se dispor a ajudar, mesmo com tão pouco tempo para isso.

Ao Engenheiro Agrônomo Cícero Doznete Pereira, pela infinita paciência com que se prestou na execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart por aceitar participar da banca examinadora desta monografia.

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos: Ana Paula, Cristiane e Katiere, que por maiores que sejam as adversidades o laboratório permanece funcionando.

A minha namorada Cristiana, que mais do que carinho e amor, nunca me deixou.

**À MINHA FAMÍLIA QUE DE TODAS AS FORMAS  
CONTRIBUIU PARA QUE ESTE MOMENTO CHEGASSE.**

**EM MEMÓRIA AO PROFESSOR Dr. PAULO SODERO  
MARTINS, QUE ME DESPERTOU O INTERESSE PELA  
PESQUISA.**

**Lista de Tabelas**

	Pág.
Tabela 1. - Soluções estoque e meio de cultura usados no experimento de micropropagação de abiu meio MS.....	14
Tabela 2. - Concentrações dos fitormônios nos diferentes Tratamentos.....	15

**Lista de Figuras**

	Pág.
Figura 1. - Experimento de diferentes concentrações de BAP, contando três tratamentos: T1 = 0,5 mg/l; T2 = 1,0 mg/l; T3 = 2,0 mg/l; T0 foi o controle sendo composto apenas de MSØ.....	17
Figura 2. - Amostra de explante contaminado.....	21
Figura 3. - Explantes que apresentaram brotação apical.....	22
Figura 4. - Explante que mostrou desenvolvimento de calo.....	23

## RESUMO

O abiu (*Pouteria caimito*) é um fruto originário da região Amazônica, e por centenas de anos vem sendo selecionado pelos índios Ticuna por meio de uma tradição que visa presentear ou pagar o dote ao pai da futura esposa com frutos de qualidade superior, tanto em tamanho quanto em sabor, uma vez que tais frutos são considerados presentes divinos na tradição local suas características devem ser preservadas através do plantio de suas sementes (CAVALCANTE, 1988).

A variedade Ticuna apresenta frutos com até dois quilos, enquanto os frutos do abieiro selvagem apresentam-se no máximo com 90 g. A árvore é de porte grande, mas a copa está ao alcance das mãos mesmo em indivíduos adultos.

Este trabalho tentou estipular um meio de cultura ideal para a micropropagação de abiu, utilizando meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com três concentrações diferentes de BAP (6-benzilaminopurina), 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l. Para isso usou-se como explantes ápices caulinares e gemas laterais provenientes de um abieiro adulto.

Foi necessário, entretanto, a realização de um experimento de desinfestação superficial em vista da alta taxa de contaminação a qual os explantes foram acometidos, sendo que este experimento consistiu em variações crescentes da concentração de hipoclorito de sódio e na exposição dos explantes aos reagentes utilizados no tratamento de desinfestação superficial.

A oxidação, principal fator limitante em experimentos anteriores, foi controlada, ou tentou-se controlar por meio de vários procedimentos, que vão do isolamento dos explantes até o meio de cultura.

Embora a taxa de oxidação tenha sido demasiadamente elevada, comprometendo a análise dos dados obtidos, conseguiu-se ao fim de dois meses

o início da brotação de meristemas apicais, brotação de gemas laterais e formação de calo proveniente de gema lateral.

## 1. INTRODUÇÃO

"O abieiro (*Pouteria caimito*), família Sapotaceae; é uma árvore que pode atingir de 4 a 10 m de altura quando cultivada e até 20 m em estado silvestre apresenta copa baixa, mesmo em plantas adultas, possui frutos de até 90 g e flores unissexuais e/ou hermafroditas" (CAVALCANTE, 1988).

Cultivado em quase todo o Brasil é encontrado comumente em estado silvestre na Amazônia, o que é um indicativo deste ser seu sítio de origem. Bastante comum nos quintais e pomares domésticos da região norte e quase sempre presente nos aldeamentos indígenas. O fruto é sempre consumido *in natura* e na Amazônia Ocidental é quase tão popular quanto o biribá (*Rollinia mucosa*), (KERR, comunicação pessoal). Embora muito popular, o fruto do abieiro, o abiu, é as vezes depreciado por conter na casca um "leite" branco e viscoso que adere aos lábios de quem o consome.

Os índios Ticuna, localizados na região do Alto Solimões, na Amazônia, selecionaram ao longo de centenas de anos diversas variedades de muitas espécies vegetais da região. Devido à crenças religiosas de que frutos grandes, saudáveis e com sabor agradável serem considerados presentes de Deus, portanto, estes deveriam ser preservados com o plantio de suas sementes e seus

frutos serviriam para presentear amigos, parentes, ou até mesmo para um jovem índio pagar o dote ao pai de sua futura esposa.

Esta seleção acabou originando a variedade Ticuna, que tem cerca de 4 a 6 m de altura, com 80 a 90 frutos de 800 a 1200 g, por árvore, a qual é abundante em ramificações, com folhagem verde clara ou escura, apresentando um belo aspecto ornamental. O fruto da variedade Ticuna é uma baga globosa, variável em tamanho e comprimento, de 8 a 12 cm de diâmetro e de 10 a 15 cm de comprimento, mostrando diferentes misturas de cores amarela e verde quando maduro. A casca do fruto é translúcida, a polpa suculenta e pouco fibrosa, de cor branca a creme, com sabor muito agradável e doce.

É desconhecido qualquer problema com relação a propagação utilizando-se sementes ou qualquer outro meio de propagação vegetativa tradicional. O uso de técnicas de micropropagação com o abiu justifica-se pela velocidade de produção de novas mudas de abieiro, além da conservação do genoma da planta matriz, sendo este ponto com certeza o de maior interesse, além da melhoria das condições fitossanitárias dos clones gerados por estas técnicas.

Em trabalhos anteriores foram experimentados diferentes meios de cultura visando sempre a obtenção de um meio propício à micropropagação do abiu. Contudo sempre houve alta taxa de oxidação dos explantes. CUNHA (1994) e SCALON (1997) concordam que os explantes são altamente susceptíveis a oxidação, e este último autor, trabalhando com abiu, obteve que a oxidação dos explantes foi maior na ausência de BAP (6 – benzilaminopurina), mas recomenda para a formação de calos a dose de 6,43 mg/l deste regulador de crescimento. O autor obteve sucesso na formação de calos de abiu trabalhando com três meios de cultura diferentes; MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), SK (SCALON & KERR, 1997) e LM (LLOYD & McCOWN, 1992), sendo que os dois primeiros apresentaram resultados muito parecidos com relação a média de

calos produzidos nesses tratamentos. Por outro lado CUNHA (1994) embora também tenha usado o meio MS, não alcançou um resultado satisfatório.

Neste estudo objetivou-se a micropropagação do abiu, a partir de ápices caulinares e gemas laterais, com o intuito de promover o desenvolvimento de plântulas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DE TECIDOS

Segundo CUNHA (1994) a lista de espécies que vem sendo micropropagadas cresce a cada ano; contudo as espécies lenhosas não têm o mesmo sucesso que espécies herbáceas, devido a alguns fatores como a relação entre idade da planta doadora de explantes e o segmento que será fonte de explantes, quanto maior o estágio de maturação da planta, menor a juvenilidade e a competência para a organogênese e regeneração *in vitro* (ANDRADE, 1998).

Outro fator que tem dificultado a cultura *in vitro* de lenhosas é a oxidação dos explantes, sendo esta provocada pelo acúmulo de compostos fenólicos resultantes da atividade fisiológica do próprio explante. Mesmo com taxas de oxidação tão altas, tanto PAZETO (1994), CUNHA (1992) e SCALON (1997), conseguiram induzir formação de calos." O calo constitui-se numa massa não organizada de células indiferenciadas, ou que retornaram ao seu estado indiferenciado" (EVANS *et al.*, 1983). Portanto o calo pode ser induzido a partir de qualquer parte da planta mediante a presença de fitormônios ou reguladores

de crescimento numa concentração ótima para tal resultado (MANTELL *et al.*, 1994).

Em cultura de tecidos sabe-se que altas doses de BAP (6-benzilamino purina) leva à formação de calo na fase de estabelecimento, e que em contra partida, baixas concentrações do mesmo regulador de crescimento acarreta na brotação de meristemas apicais e de gemas laterais, dando origem portanto a plântulas; dependendo da espécie vegetal trabalhada (GRATTAPLAGLIA & MACHADO, 1993).

A formação de calo pode trazer desvantagens aos explantes uma vez que a desdiferenciação irregular pode ter como consequência a variação somaclonal no calo e, assim, tendo um resultado diferente do esperado (EVANS, *et al.*, 1983).

## 2.2. MICROPROPAGAÇÃO

As diferentes técnicas de micropropagação dependem, de maneira geral, da assepsia, do genótipo do material, da composição do meio de cultura e segundo SENNA NETO *apud* LUZ (1993), dos objetivos e da metodologia de condução do trabalho.

De acordo com MANTELL *et al.* (1994) há uma diferença técnica entre a cultura de meristemas e a cultura de ápices caulinares, sendo que na primeira é usado apenas o tecido meristemático do ápice caulinar; a cultura de ápices caulinares é feita usando-se toda a porção apical do caule com um tamanho de cerca de 2 a 4 mm de comprimento, permitindo a permanência de um ou dois primórdios foliares. A cultura de meristemas é usada para a limpeza clonal, além de ser possível regenerar uma planta inteira a partir de células meristemáticas

sem o risco de variações no conteúdo genético da planta (EVANS *et al.*, 1983; MANTELL *et al.*, 1994).

A condição fitossanitária da planta matriz é importante na medida que irá determinar a facilidade em se descontaminar o explante durante o isolamento. Apesar de se realizar uma desinfestação dos explantes, diversos microorganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados já na planta matriz. A primeira medida é a manutenção da planta matriz em ambiente mais limpo, como uma casa de vegetação ou câmara de crescimento, uma vez que no campo a planta está exposta a todo tipo de intempérie e insetos que provocam ferimentos e permitem a entrada de microorganismos" (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1993).

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1993) consideram ainda a importância da época de retirada dos explantes, sendo este fator um importante determinante do comportamento da cultura *in vitro*.

CUNHA (1994) e SCALON (1997) não dão referências à época de retirada dos explantes de abiu, com isso torna-se impossível alguma comparação com esta variável.

De forma geral a micropropagação segue quatro etapas básicas: estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimação.

O estabelecimento compreende aos cuidados iniciais com a planta doadora de explantes, tratamento com fungicidas na véspera da retirada dos explantes, permanência da planta doadora de explantes em casa de vegetação em substrato esterilizado e evitando o contato com o chão. Além desta parte preparatória inclui ainda a retirada dos explantes, a desinfestação superficial e finalmente a inoculação *in vitro*; sendo que nesta última etapa frequentemente utiliza-se meio MS e em alguns casos não há necessidade de reguladores de crescimento, porém a adição de citocininas tem se mostrado favorável, ou até necessária, podendo variar bastante em função da espécie e do tipo de explante.

Concentrações da ordem de décimos de miligrama são mais comuns para o cultivo de ápices caulinares, enquanto que segmentos nodais e ápices inteiros são submetidos a concentrações maiores. A citocinina mais usada é a 6-Benzilaminopurina (BAP), sendo este usado com bastante sucesso em concentrações variando de 0,05 a 0,1mg/l em herbáceas e lenhosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1993).

A fase de multiplicação depende de três fatores: a composição do meio de cultura utilizado; as condições ambientais de crescimento; e os cuidados na manipulação do material durante as subculturas.

Com relação ao meio de cultura, as variações mais frequentes dizem respeito à composição dos macronutrientes, sendo alguns como o nitrato de amônia reduzido, e outros como o cloreto de cálcio aumentado. Outra variação frequente é nas concentrações dos reguladores de crescimento. As concentrações de citocinina nesta fase variam de 0,1 a 5,0mg/l (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1993).

Outros reguladores de crescimento como auxinas e giberelinas nem sempre se fazem necessários nos meios de cultura, pois o explante já tem uma dose endógena capaz de lhe suprir, tanto na fase de estabelecimento, quanto na multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1993).

A fase de enraizamento tem por objetivo a formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo assim, o posterior transplântio para condições *ex vitro*. Esta etapa pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*, dependendo das condições da plântula formada e da infraestrutura disponível (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1993).

Os meios de cultura para o enraizamento *in vitro* tem a concentração de macronutrientes diminuída, uma vez que concentrações elevadas de macronutrientes inibem o enraizamento. As auxinas são usadas regularmente na indução da parte radicular da planta, sendo as mais usadas são o IBA (ácido

indolbutírico) e o ANA (ácido naftalenoacético), sendo que suas concentrações variam muito de espécie para espécie e também podem ser usados em associação com citocininas e giberilinas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1993).

Durante a aclimação pode ser realizado o enraizamento *in vivo*, sendo que a plântula é mantida em substrato esterilizado e irrigado regularmente com uma solução nutritiva (semelhante ao meio de cultura) contendo os reguladores de crescimento em suas devidas proporções.

A aclimação é sempre feita em casa de vegetação em condições mais assépticas possíveis e com controle de temperatura, luminosidade e umidade dependendo da espécie, preparando dessa forma a planta para o transplante direto ao solo.

### 2.3. MICROPROPAGAÇÃO DE LENHOSAS E OXIDAÇÃO

PAZETO (1994), trabalhando com biribá (*Rollinia mucosa*), obteve uma taxa de oxidação de 61.4% após 60 dias, sendo este apenas um dentre inúmeros exemplos dos índices elevados que a oxidação atinge em cultura de tecidos de espécies lenhosas.

Visando atender as necessidades de cada espécie ou genótipos, normalmente são feitas alterações nas concentrações, totais ou parciais, dos constituintes de um meio de cultura.

SCALON (1997) trabalhou com três meios de cultura, que se diferenciavam nas concentrações de sais e vitaminas, sendo estes meios o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), LM (LLOYD & McCOWN, 1981) e SK (SCALON & KERR, 1997). Destes, tanto o meio MS quanto o SK apresentaram

resultados semelhantes e o meio LM teve um desempenho inferior aos outros, que segundo este autor deve-se a ausência de vitaminas neste último meio.

CUNHA (1994), já havia determinado um tratamento de desinfestação superficial adequado ao abiu, permitindo que a desinfestação fosse feita com o mínimo de injúria sofrida pelo material vegetal. Os trabalhos feitos com o abiu tratavam tão somente da alteração da concentração dos constituintes do meio de cultura, tanto sais como reguladores de crescimento, com o intuito de promover algum tipo de crescimento ou brotação. Mas esbarraram na oxidação dos explantes.

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1993) e MANTELL *et al.*(1994) fornecem inúmeros recursos com os quais se pode combater as eventuais oxidações do material vegetal, lembrando que essas medidas não estão apenas relacionadas com o meio de cultura, mas também com a manipulação do material vegetal. Questões simples como o instrumental aquecido em contato com o material vegetal podem causar oxidação no mesmo; a desidratação do material vegetal pode acarretar em oxidação; além de várias sugestões para se alterar o meio de cultura adicionando-se antioxidantes como o carvão ativado, e até metodologias demasiadamente trabalhosas como repicagens diárias com o intuito de se reduzir a concentração de compostos fenólicos resultantes do metabolismo do explante, que pode vir a ser oxidante.

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1993) "o pH do meio de cultura é também um aspecto que deve ser considerado, por ele influenciar a disponibilidade de nutrientes e fitorreguladores de crescimento e o grau de solidificação do ágar. De modo geral, o crescimento de células vegetais *in vitro* não é influenciado dentro de uma faixa de pH que vai de 4 a 7. Do ponto de vista prático, o pH do meio é ajustado antes da autoclavagem para um valor entre 5,5 e 6. Este valor não se mantém durante o crescimento das culturas. Além das alterações devido à autoclavagem, as próprias culturas alteram

significativamente o pH do meio seja pela absorção diferencial de nutrientes como através do fluxo de íons  $H^+$ .

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este experimento foi conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

#### **3.1. MATERIAL VEGETAL**

O material vegetal usado constituiu-se de ápices caulinares e gemas laterais do abieiro, que foram extraídos da planta matriz entre outubro e dezembro de 1998. A planta doadora de explantes é um abieiro adulto, situada em Uberlândia, MG. Esta planta é proveniente de semente de uma planta que produz frutos com cerca de 700 g no estado do Maranhão, resultado de centenas de anos de seleção dos índios Ticuna.

### 3.2. TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO

Em um primeiro momento o tratamento de desinfestação utilizado foi o sugerido por CUNHA (1994), que consistia de uma leve escovação do material vegetal com detergente comercial em água corrente, seguindo-se de imersão em álcool 70% por 1 minuto, e hipoclorito de sódio 10% e TWEEN 20 5% por 5 minutos, seguido de três lavagens em água autoclavada contendo carvão ativado (5 mg/l), sendo que o carvão ativado foi adicionado neste trabalho como uma medida antioxidante.

Um experimento de desinfestação superficial foi necessário em virtude de problemas com a contaminação dos explantes, este consistiu de imersão rápida (20 segundos) em álcool 70%, de imersão de 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações 25%, 50%, 75%, e hipoclorito de sódio absoluto (em sua concentração comercial), sendo seguido de três lavagens em água esterilizada com carvão ativado (5 mg/l). Num total de 4 tratamentos com 20 explantes por tratamento.

### 3.3. TRATAMENTO ANTIOXIDANTE

O tratamento antioxidante consistiu da imersão em solução aquosa de carvão ativado (5 mg/l) logo após a escovação dos explantes em água corrente e isolamento dos mesmos em segmentos nodais ou ápices caulinares. Uma solução semelhante foi usada após o tratamento de desinfestação superficial para deixar o material vegetal em repouso até sua inoculação final em meio de cultura.

**Tabela 2 - Concentrações dos fitohormônios nos diferentes tratamentos**

Tratamentos	Hormônio	Concentração mg/ml (solução estoque)	Concentração final em 250 ml de meio (mg)
T <sub>1</sub>	BAP	0,5	0,5
T <sub>2</sub>			1,0
T <sub>3</sub>			2,0

### 3.5. INOCULAÇÃO *in vitro*

O material vegetal após ter sido colhido da planta matriz foi levado ao laboratório onde foi desfolhado e sofreu uma lavagem em água corrente e detergente comercial, as gemas laterais e os ápices caulinares foram separados dos demais tecidos e permaneceu imerso em solução aquosa de carvão ativado (5 mg/l).

Este material foi retirado da solução aquosa de carvão ativado para que fosse dada continuidade no tratamento de desinfestação superficial já na câmara de fluxo, que após seu final o material biológico voltou a ser imerso numa solução semelhante a anterior.

Como os ápices e gemas laterais já haviam sido separados antes do tratamento de desinfestação superficial os explantes foram inoculados em meio de cultura cerca de vinte minutos após a imersão na solução de carvão ativado, afim de garantir a máxima retirada das soluções usadas no tratamento de desinfestação em contato com o explante.

Uma vez inoculados os explantes permaneceram em sala de crescimento a 25°C e com fotoperíodo de 16 horas.

Este mesmo procedimento foi tomado tanto para o experimento de tratamentos de desinfestação quanto para o experimento do meio de cultura (Figura 1), sendo que neste experimento o tratamento de desinfestação usado foi o que contava com imersão em hipoclorito de sódio absoluto.



**FIGURA 1** - Experimento de diferentes concentrações de BAP, contando com três tratamentos: T1 = 0,5 mg/l; T2 = 1,0 mg/l; T3 = 2,0 mg/l; T0 foi o controle sendo composto apenas de MSØ.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora o tratamento de desinfestação superficial estivesse já bem protocolado em estudos anteriores, a contaminação por fungos constituiu-se no maior empecilho no desenvolvimento deste trabalho.

Pelo fato do experimento ter sofrido uma alta taxa de contaminação, que chegou a 93,75%, não foi possível recolher dados para que uma análise estatística fosse feita com relação ao desempenho das diferentes concentrações de BAP e do tratamento antioxidante, uma vez que quase a totalidade dos explantes estavam contaminados em apenas 15 dias por um fungo (Figura 2).

Ainda que seja insignificante, o restante do material vegetal (6,25%) deu início a regeneração. Desses, 2,5% deram origem a brotação de ápices caulinares (Figura 3), 2,5% brotação de gemas laterais e observou-se também uma formação de calo (Figura 4) correspondendo a 1,25%; estes resultados foram obtidos com o meio "MS"+BAP 2 mg/l. Dessa forma pode-se considerar que o meio de cultura teve um desempenho no mínimo aceitável em vista as adversidades encontradas no decorrer deste trabalho, sendo portanto que em trabalhos futuros há de se examinar um espectro muito menor para se determinar a concentração ótima afim de se estimular a brotação de meristemas apicais e gemas laterais.

Os explantes não apresentaram perda de vigor em função do tratamento de desinfestação, sugerindo que um tempo maior de exposição na desinfestação pode ser utilizado. No tocante a concentração das substâncias que promoveram a assepsia dos explantes, não é aconselhável qualquer mudança, uma vez que o hipoclorito de sódio foi utilizado absoluto (em sua concentração comercial) e a eficiência do álcool é mais do que comprovada quando usado a 70%.

O tratamento antioxidante parece ter mostrado-se eficiente uma vez que só foram observadas oxidações no experimento controle. Contudo não se pode admitir a eficiência uma vez que é provável que os explantes não tenham tido tempo de se oxidar em virtude da alta taxa de contaminação e da velocidade com a qual esta se disseminou.

A alta taxa de contaminação certamente foi devida a uma contaminação endofítica, uma vez que todos os procedimentos para perfeita assepsia dos materiais foram tomados. Outro fator que fortalece a hipótese de uma contaminação endofítica é que a planta doadora de explantes estava no campo, estando sujeita portanto ao ataque de insetos ou qualquer injúria que pudesse permitir a entrada de organismos patogênicos na planta. Ainda pode-se considerar o fato da contaminação sempre surgir primeiramente no explante e daí para o meio de cultura.

Uma alternativa para se eliminar o agente contaminante é a introdução de plantas doadoras de explantes em casa de vegetação, sendo que neste ambiente controlado as plantas devem ser tratadas com fungicidas e só depois de comprovada a sanidade das plantas o cultivo *in vitro* deve começar.

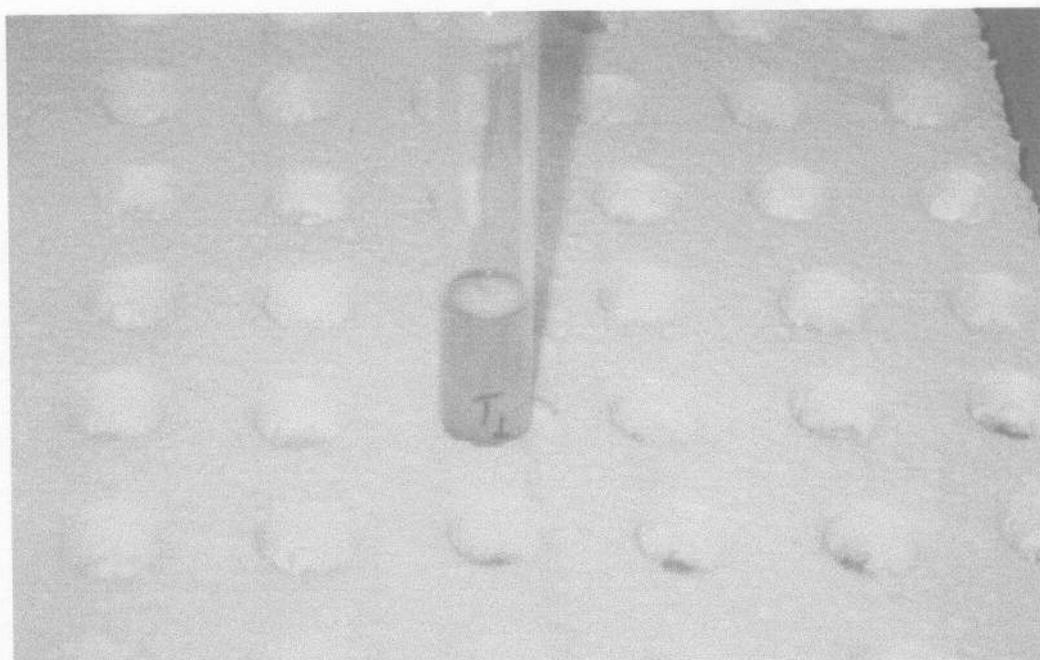
Uma outra alternativa que diz respeito ao uso de fungicidas no meio de cultura, sendo esta última alternativa a menos indicada, pois o uso de fungicidas no meio de cultura pode promover mutações no explante e então o objetivo de conservar o genoma da planta doadora de explantes estaria perdido. A

germinação *in vitro* poderia também ser um recurso utilizado, ou mesmo a cultura de embriões, já que a planta seria obtida em ambiente estéril.

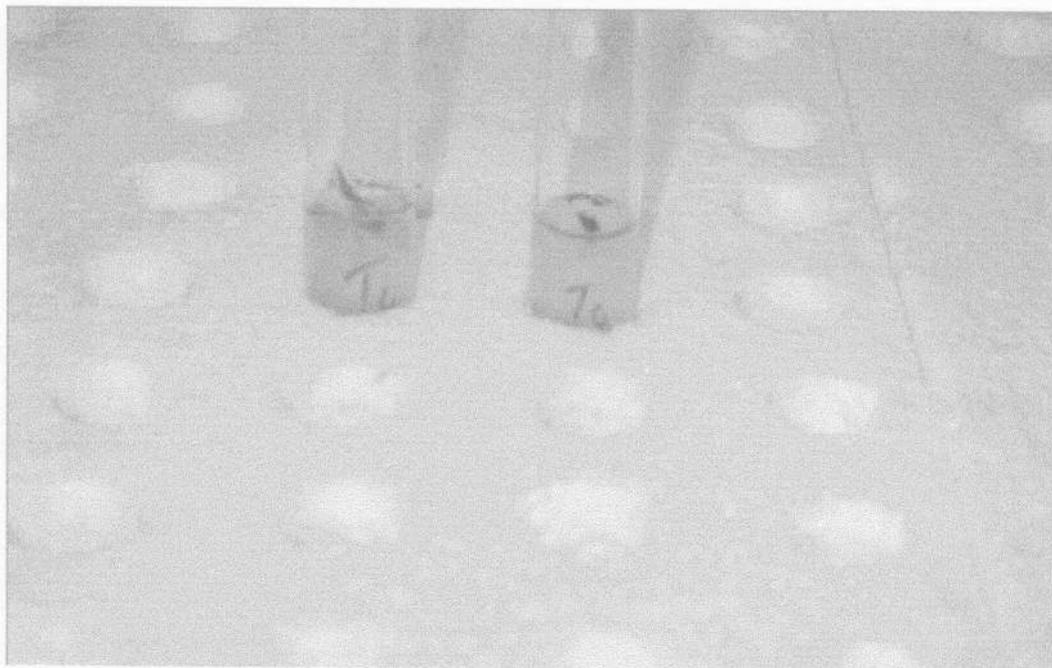
A idade da planta doadora de explantes é outro fator a ser levado em consideração, uma vez que esta planta já é adulta, prejudicando assim o processo de micropropagação.

A permanência do material vegetal em solução aquosa de carvão ativado contribuiu para que os explantes permanecessem não apenas hidratados, mas também em presença de um agente antioxidante, durante todo tempo desde a limpeza em água corrente até a inoculação *in vitro*.

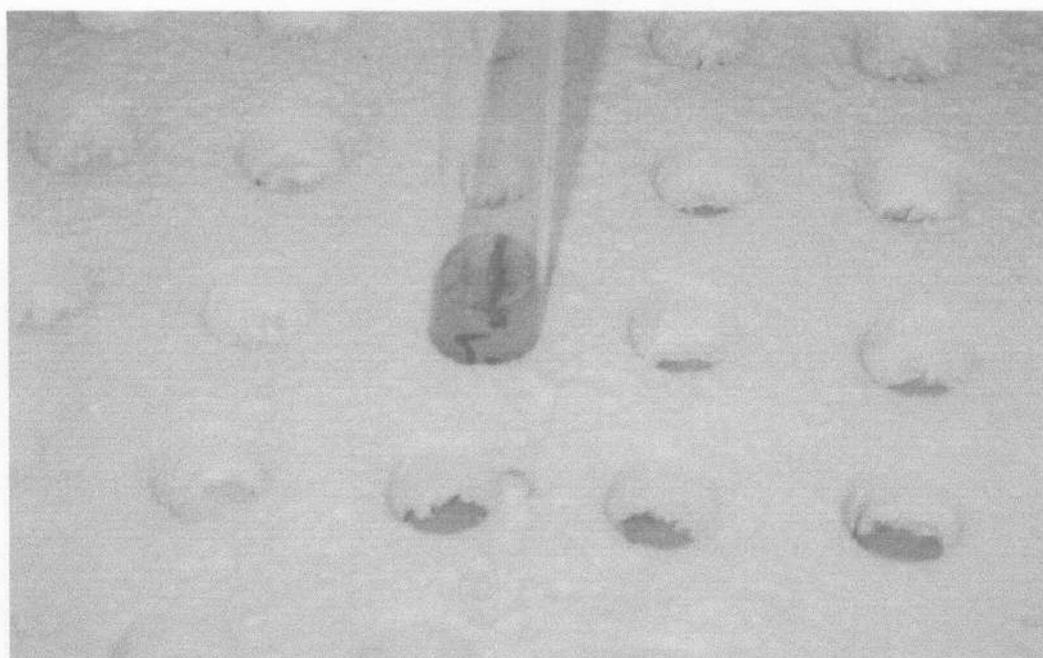
Algumas mudanças no meio de cultura foram feitas na tentativa de se reduzir os elevados índices de oxidação apresentados em estudos anteriores, elevou-se o pH do meio de 5,7, usualmente empregado em cultura de tecidos, para 6,2, imitando dessa forma o pH do solo da região de origem da planta matriz (KERR, comunicação pessoal); e o carvão ativado foi fornecido ao meio de cultura na razão de 2% peso/volume. Todos os tratamentos, inclusive no experimento de desinfestação superficial, receberam carvão ativado na referida dose.



**FIGURA 2 -** Amostra de explante contaminado.



**FIGURA 3** - Explantes que apresentaram brotação de meristema apical, provenientes do experimento de desinfestação superficial T4.



**FIGURA 4** - Explante que mostrou desenvolvimento de calo, proveniente do experimento de desinfestação superficial, T3.

## 5. CONCLUSÕES

O tratamento de desinfestação superficial não foi eficiente tendo em vista a contaminação quase que total dos explantes.

Não se pode afirmar que o tratamento antioxidante foi eficaz, uma vez que o número de explantes que permaneceram não contaminados foi muito reduzido e portanto os explantes em sua maioria não tiveram tempo de apresentar oxidação.

As concentrações de BAP a 0,5 e 1 mg/l não forneceram nenhum resultado em virtude da contaminação. Os explantes que deram origem às brotações de meristemas apicais, gemas laterais e formação de calo eram remanescentes do experimento de desinfestação superficial, em que foi usado apenas meio "MS" com 2 mg/l de BAP.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, M. W.; 1998; *Micropropagação da Aroeira (Myracrodruon urundeuva Fr. All.)*. Fortaleza, UFC; 50p. (Dissertação de Mestrado).  
1
2. CAVALCANTE, P. B.; 1988; *Frutas Comestíveis da Amazônia*; 4ª edição; Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; pp 279.
3. CUNHA, F. N.; 1994; *Propagação de abiu (Pouteria caimito) "in vitro" a partir de gemas axilares em meio MS modificado*; Uberlândia : UFU; 35p ( Monografia apresentada para a obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo ). 2
4. EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y.; 1983, *Handbook of Plant Cell Culture*, Volume 1, 1ª edição, MACMILLAN, New York, pp 13-82.

5. GRATTAPAGLIA, P.; MACHADO, M. A.; 1990; Micropropagação; In: TORRES, C. A.; CALDAS, L. S.; *Técnicas e aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas*; Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH; pp 09 – 169.
6. LLOYD, McCOWN; 1991/92; Sigma molecular biology. 188p. p53.
7. LUZ, J. M. Q.; 1993; *Obtenção in vitro de plântulas de Mandioquinha Salsa (Arracacia xanthorrhiza Bancroft) via cultura de meristemas*; Lavras, UFLA (Dissertação de Mestrado). 3
8. MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; NICKEE, R. A.; 1994, *Princípios de Biotecnologia em plantas - Uma Introdução à Engenharia Genética em Plantas*; Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, pp.101-148.
9. MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; 1962, A Revised Medium for Rapid growth and Bio-assays with Tobacco Tissue, *Physiologia Plantarum*, (Kobenhaum) 15: 436- 496.
10. PAZETO, L. D.; 1994; *Micropropagação de Biribá (Rollinia mucosa), Annonaceae, por meio de gemas axilares in vitro*; Uberlândia, UFU, 46p, (Monografia apresentada para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo). 2

11. SENNA NETO, N; 1990; *Micropropagação de Mandioquinha Salsa (Arracacia xanthorrhiza Bancroft)*; Viçosa, UFV, 53p (Tese de Mestrado). 4
12. SCALON, V. D. O.; 1997; *Micropropagação de Abiu (Pouteria caimito) em diferentes meios de cultura*; Uberlândia: UFU; 37p ( Monografia apresentada para a obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo ). 2

As referidas monografias e dissertações de mestrado são encontradas nas bibliotecas das seguintes universidades:

- 1- UFC- UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
- 2- UFU- UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
- 3- UFLA- UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
- 4- UFV- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA