

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADES DE PESQUISA EM CULTURA DE TECIDOS
VEGETAIS COM ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS**

Aluno: Mariana Moresco Lüdtke
Supervisora: Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger
Orientadora: Prof^a Dr^a Suzana Stefanello

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito
parcial para a conclusão do
CURSO DE GRADUAÇÃO
EM TECNOLOGIA EM
BIOTECNOLOGIA

PALOTINA - PR

Agosto de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADES DE PESQUISA EM CULTURA DE TECIDOS
VEGETAIS COM ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS**
ÁREA: Biotecnologia Florestal

Aluno: Mariana Moresco Lüdtke
Supervisora: Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger
Orientadora: Prof^a Dr^a Suzana Stefanello

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado como
requisito parcial para a
conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA EM
BIOTECNOLOGIA

PALOTINA - PR

Agosto de 2013

“O amor não está nem ai para
o que acreditamos e deixamos de acreditar.
Ele acontece, apesar de nós.
Liberdade na vida é ter um amor para se prender.”

Fabício Carpinejar

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por proporcionar a concretização desta importante etapa.

A minha família, pais, avós, tias, tios e primos, por todo o amor, carinho, dedicação e confiança, não terei palavras para agradecer todo o esforço feito por vocês para a realização de mais este sonho.

Aos meus avós que prestaram suporte, estiveram do meu lado durante esse período me aconselhando e me confortando.

A minha orientadora, professora Dra. Suzana Stefanello, exemplo de profissionalismo e caráter, por todo o aprendizado profissional e pessoal que me proporcionou. Pelo apoio, por estar sempre presente, pela sua dedicação, pelos seus conselhos e entendimentos, pelas oportunidades e pela parceria desde o princípio.

A minha supervisora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela oportunidade, pelo ensino e dedicação para que fosse possível a conquista de mais esta etapa da minha vida. Muito obrigada!

À Universidade Federal do Paraná e aos professores do curso de Tecnologia em Biotecnologia pela minha formação.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização do estágio.

Aos meus colegas de laboratório, Charlene, Sílvia, Jaqueline, Carla, Aline Paim, Enrique, Júlio, Aline Curti, Leonardo, Karol, Clarissa, Victoria e Iana, obrigada pelo auxílio, paciência, conversas e amizade.

Ao meu irmão e amigo Matheus, por tudo que sempre fez por mim, pelos conselhos, e amizade.

Às minhas amigas Fernanda, Isadora, Laís Fernanda, Gabriela, Evelyn, Flávia, Jéssica e Carolini e meu amigo Luís Felipe por estarem comigo em todos os momentos e pela amizade.

Aos meus colegas de faculdade, por todos esses anos de convivência e amizade.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	9
2.1.1 Meios nutritivos e fitorreguladores.....	9
2.1.2 Desinfestação superficial dos explantes.....	12
2.2 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS.....	15
2.2.1 Canafístula (<i>Peltophorum dubium</i> (Spreng.) Taub.).....	15
2.2.2 <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.).....	16
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	20
4.2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO.....	21
4.2.1 Germinação de sementes de <i>Peltophorum dubium</i> em meio ágar-água.....	21
4.2.2 Inoculação de explantes de <i>Luehea divaricata</i> provenientes de plântulas germinadas <i>in vitro</i> em meio WPM e MS com Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na ausência e na presença de carvão ativado.....	23
4.2.3. Acompanhamento de atividades de coleta de amostras de tecidos vegetais para fins de isolamento de DNA.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL	24
5.1.1. Esterilização em autoclave.....	24

5.1.2. Preparo de etanol 70% (v/v) para assepsia.....	26
5.2 PREPARO DE MEIOS DE CULTURA WPM E MS.....	26
5.3 INOCULAÇÃO DE SEMENTES E EXPLANTES EM CÂMARA DE FLUXO LAMINAR.....	30
5.4 OUTRAS ATIVIDADES.....	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Há grandes desafios atualmente para a humanidade, entre eles a preocupação com a preservação do meio ambiente, que se manifesta nos países desenvolvidos voltados para países em que ainda há grandes extensões territoriais cobertas por florestas tropicais e subtropicais, como é o caso do Brasil.

No entanto, embora o país apresente dimensões continentais, sendo detentor da flora mais diversificada do planeta (SANDES; DI BLASI, 2000) e, em consequência disto, vítima frequente da biopirataria; as espécies nativas não são integradas em sistemas produtivos, reduzindo a sua exploração econômica. Assim, é necessário que sejam traçadas estratégias no intuito de manter esta diversidade a partir de uma ótica sustentável, evitando-se pressões que degradem os ecossistemas naturais.

As espécies florestais são de fundamental importância econômica, pois delas originam-se diversos produtos como madeira, biomassa para polpa celulósica, papel e energia para as indústrias. Além disso, muitas espécies ofertam produtos não madeiráveis para a indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003).

Contudo, espécies florestais apresentam grande relevância para a economia brasileira. De acordo com os dados da Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS, 2007), a participação do setor florestal no Produto Interno Bruto (PIB) do país atinge 3,5%, o que equivale a US\$ 37,3 bilhões. São gerados 4,33 milhões de empregos relacionados às florestas plantadas e, no tocante às florestas nativas, 2,58 milhões.

Com a crescente compreensão da função ecológica das florestas para a sustentabilidade da vida no planeta e as possíveis consequências decorrentes da exploração indiscriminada, florestamentos e reflorestamentos encontram-se nas agendas de diversas nações (MURALIDHARAN; KALLARACKAL, 2004). Utilizar a biotecnologia para o ganho de produtividade e sustentabilidade pode ser considerado, de acordo com Watanabe e Raman (1997), como uma das prioridades mundiais, já que a excessiva demanda por produtos oriundos de espécies vegetais, bem como o subsídio à sustentabilidade e à proteção do meio ambiente, necessitam destas técnicas para sua manutenção.

A propagação vegetativa está entre os principais métodos de multiplicação de espécies florestais, a qual é extremamente vantajosa quando comparada à reprodução sexuada, pois permite reproduzir o componente genético total, conseqüentemente, existem maiores ganhos em uma mesma geração (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Neste contexto, encontram-se as técnicas de cultura de tecidos vegetais, as quais oferecem potencial para a rápida

multiplicação de linhagens elite em larga escala. Em árvores, estas tecnologias são essenciais frente aos longos períodos necessários à multiplicação e à maturação das plantas (JAIN, 1997).

Assim, vários estudos vêm sendo desenvolvidos com espécies florestais nativas, os quais visam obter informações sobre o comportamento dessas espécies submetidas ao cultivo *in vitro*, bem como contribuir com formas alternativas de propagação e conservação para essas espécies.

Diante do exposto, este relatório descreve algumas atividades desenvolvidas durante o estágio realizado no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, no período de abril a julho de 2013. As atividades envolveram a realização de procedimentos de rotina do laboratório bem como o acompanhamento de experimentos de cultura de tecidos com as espécies florestais *Peltophorum dubium* (canafístula) e *Luehea divaricata* (açoita-cavalo).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação é um processo, no qual pequenos fragmentos vegetais são isoladas dos organismos ou obtidas a partir destes, sendo assepticamente cultivadas em um meio de cultura apropriado sob condições favoráveis (AMARAL, SILVA, 2003). Tais características permitem aos tecidos, células e órgãos vegetais serem mantidos indefinidamente em cultura. De acordo com Vasil *et al.* (1979), algumas células são capazes de serem separadas do organismo e continuarem crescendo independentemente, o que permite também a cultura de células *in vitro*.

A cultura de tecidos consiste em um processo biotecnológico de cultivo de órgãos, células ou tecidos vegetais em meio nutritivo apropriado, em condições ambientais assépticas. É uma técnica que oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo. Facilita a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em área reduzida de laboratório (PAIVA; GOMES, 1995).

O uso da propagação vegetativa *in vitro* como instrumento para a implantação de florestas clonais, substituindo-se as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos tem aumentado expressivamente durante os últimos anos (BASSAN, 2006).

O estabelecimento e a multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* dependem da combinação adequada de variáveis que, sujeita à influência de diversos fatores, proporciona o sucesso da propagação para cada espécie. As concentrações dos sais e dos reguladores de crescimento nos meios de cultura, bem como a temperatura e fotoperíodo, são os fatores que mais variam entre as técnicas utilizadas para a micropropagação. Outras variáveis como a utilização de agentes geleificantes dos meios de cultura, o tamanho dos frascos e os tipos de tampa empregadas no fechamento dos recipientes, pode influenciar o desenvolvimento de algumas plantas (SOUZA *et al.*, 1999).

2.1.1 Meios nutritivos e fitorreguladores

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o

padrão de desenvolvimento *in vitro*. Baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas nas condições de cultivo *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998; TORRES *et al.*, 2001).

Com base nessas exigências, a composição dos meios de cultura utilizados para a micropropagação varia entre as espécies e as diferentes etapas do processo (estabelecimento, multiplicação e enraizamento). De modo geral, são compostos basicamente de macro e micronutrientes, vitaminas, mio-inositol, sacarose, água, agentes geleificantes e suplementos de ferro. Quando necessário são adicionados outros componentes, tais como reguladores de crescimento, aminoácidos dentre outras substâncias (DOODS; ROBERTS, 1995).

O crescimento e desenvolvimento das plantas dependem de sinais internos e externos que são transportados de uma parte para outra da planta através dos hormônios (HINOJOSA, 2000). Essas substâncias podem ser produzidas pelas plantas (fitohormônios) ou podem ser sintéticas (fitorreguladores) (HARTMANN *et al.*, 2002). A adição destas substâncias sintéticas no meio visa suprir possíveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento mais usados na cultura de tecidos. Neste sistema a morfogênese é regulada pela disponibilidade e interação dessas classes de reguladores (SKOOG; MILLER, 1957).

Skoog e Miller (1957) demonstraram que a reação do tecido *in vitro* depende do balanço entre auxina e citocinina: aumentando a concentração de auxina haveria a formação de raízes; aumentando a de citocinina haveria formação de gemas adventícias; e, numa relação intermediária a formação de calo, o qual é considerado um tecido indiferenciado, ou pouco diferenciado, podendo ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente sofrer diferenciação para formar gemas caulinares ou raízes, conforme o balanço hormonal oferecido (SKOOG, MILLER, 1957).

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento tem se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares, condições estas fundamentais para o desenvolvimento da planta.

Hinojosa (2000) define os hormônios vegetais como substâncias orgânicas naturais, ativas em concentrações muito baixas, produzidas em um tecido e transportadas para outro, onde provocam respostas fisiológicas. Por outro lado, Grattapaglia e Machado (1998) explicam que se, em caso de combinações de hormônios, não houver um balanço entre eles, as concentrações excessivas de auxina, quando utilizadas, podem inibir a multiplicação ou

favorecer a formação de calo, enquanto as de citocinina, por exemplo, podem reduzir o tamanho dos brotos.

As citocininas são substâncias reguladoras de crescimento envolvidas principalmente na divisão, crescimento e diferenciação de células. O tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais afetam o cultivo *in vitro*. O BAP (Benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação de partes aéreas e a indução de gemas adventícias, além de ser a mais barata de todas as citocininas (HASEGAWA, 1980; HU, WANG, 1983; ZAERR, MAPES, 1985).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer por organogênese ou embriogênese somática. A organogênese pode ser definida como o processo em que as células e os tecidos são induzidos a sofrer mudanças que levam à formação de uma estrutura unipolar, podendo ser um primórdio caulinar ou radicular, cujo sistema vascular se encontra conectado ao explante original. Diferentemente, a embriogênese somática leva à produção de uma estrutura bipolar, contendo ápice caulinar e radicular, com um sistema vascular independente (THORPE, 1994).

A produção de plantas *in vitro* pode ocorrer por duas vias, direta ou indiretamente. Na organogênese direta, acontece a formação de órgãos diretamente, sem a passagem por fases intermediárias, enquanto que, na organogênese indireta, passa-se, obrigatoriamente, pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De forma geral, o sistema de produção vegetal está dividido em fases, sendo estas: I- seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura nas condições *in vitro*; II- multiplicação dos propágulos, mediante sucessivas subculturas em meio de cultura adequado à propagação; III- enraizamento dos propágulos vegetativos, obtidos no estágio anterior; e IV- aclimatização das plantas obtidas *in vitro*, na condição *ex vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; XAVIER *et al.*, 2009).

Na maioria dos casos, os meios de cultura mais usados para as espécies florestais são o MS de Murashige e Skoog (1962), cuja a formulação é a mais utilizada para diferentes processos de cultura de tecidos e o WPM (Woody Plant Medium) elaborado por Lloyd e McCown (1981), para a propagação de plantas lenhosas, visto que a principal diferença do meio MS para os demais meios é sua alta concentração de sais, sendo muitas vezes utilizado em diluições (MANTOVANI; FRANCO, 1998), conforme a Tabela 1.

TABELA 1 - Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981).

Nutriente	WPM (mg L ⁻¹)	MS (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556,000	0
NH ₄ NO ₃	400,000	1650,000
KNO ₃	0	1900,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	96,000	440,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000	370,000
KH ₂ PO ₄	170,000	170,000
K ₂ SO ₄	990,000	0
Micronutrientes		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300	22,300
H ₃ BO ₃	6,200	6,200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	8,600
KI	0	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,250	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	0,025
Ferro – EDTA		
Na ₂ EDTA	37,250	37,250
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850	27,850
Vitaminas		
Tiamina.HCl	1,000	0,100
Ácido Nicotínico	0,500	0,500
Piridoxina - HCl	0,500	0,500
Glicina	2,000	2,000
Mio-inositol	100,000	100,000

*Dados adaptados de Xavier et al. (2009).

2.1.2 Desinfestação superficial dos explantes

Alguns microrganismos podem ser endógenos ou estarem latentes, tanto em sementes como em brotos, tendo assim, a desinfestação como uma etapa problemática, na qual o desinfestante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal, sem danificá-lo. Por essa razão, muitas vezes, a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos é difícil e, apenas com os meristemas retirados, estarão livres de microrganismos (BONGA; DURZAN, 1985).

A desinfestação do material juvenil geralmente não é difícil; entretanto, também são utilizados explantes de material adulto ou de plantas crescidas em condições de campo. A desinfestação de explantes coletados no campo é mais complicada, pois as percentagens de contaminação são frequentemente altas, quando comparadas aquelas de explantes juvenis ou retirados de mudas mantidas em casa-de-vegetação nas quais a contaminação pode ser reduzida por pulverizações com inseticidas e fungicidas (BONGA; ADERKAS, 1992).

Na introdução de explantes em condições *in vitro* a contaminação é bastante frequente, por eles estarem expostos às condições naturais, que são fontes de microrganismos. No meio de cultura, o crescimento desses microrganismos, maioria não patogênica, é acelerado a ponto de competirem por nutrientes com os explantes, prejudicando o desenvolvimento destes (YAMAZAKI, 1995; apud XAVIER *et al.*, 2009).

Para evitar a contaminação das culturas, devem ser mantidos em frascos fechados e esterilizados mas, que permitam a troca gasosa no interior dos frascos com o exterior. A introdução dos explantes nos frascos pode permitir a entrada de microorganismos do ar, surge então, a importância de uma instalação com características apropriadas, bem como equipamentos e normas de trabalho que possibilitem a criação de um ambiente externo ao frasco com elevado nível de assepsia (TEIXEIRA; TORRES, 1998)

A superexposição do tecido aos agentes desinfetantes, no geral, danifica o explante e leva à morte celular, sendo difícil recomendar um procedimento padrão, assim é necessário investigar os procedimentos de desinfestação para os diferentes tipos de espécies e tecidos, para que o cultivo *in vitro* inicie com explantes saudáveis e a cultura desenvolva-se com sucesso (SMITH, 2000).

Dentre os agentes usados para a desinfestação dos explantes, inclui-se o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, o peróxido de hidrogênio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Outras substâncias com ação germicida, também, são utilizadas na desinfestação dos explantes, sendo comum o etanol e os compostos à base de cloro, como hipoclorito de sódio e de cálcio. As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição podem variar bastante (XAVIER *et al.*, 2009).

O etanol e os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio, são os princípios ativos com ação germicida, mais utilizados na desinfestação. O hipoclorito de cálcio apresenta a vantagem de ser menos tóxico para os tecidos do que o sódio. As concentrações mais comuns variam de 0,5 a 2,0% de cloro ativo, e o tratamento dura até 40 minutos, para tecidos lignificados. Já o etanol é utilizado no geral, a 70% e 80%; acima desta

concentração é ineficiente e pode até desidratar os tecidos, o tempo de exposição varia de algumas dezenas de segundos até alguns minutos, dependendo da consistência do tecido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Uma vez obtida as condições desejadas na etapa de estabelecimento da cultura *in vitro*, a etapa seguinte refere-se à multiplicação da cultura para a obtenção da quantidade de mudas micropropagadas desejadas, quando se visa atingir alta taxa de multiplicação, com o mínimo de variação de explante para explante, livres de contaminantes que prejudiquem a micropropagação, gemas reativas e que produzam partes aéreas com qualidade suficiente para a fase seguinte (XAVIER *et al.*, 2009).

Este processo é realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar, utilizando vidraria previamente esterilizada. Após a desinfestação, são efetuadas três lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada, geralmente três, para a remoção dos resíduos dos agentes desinfestantes (WENDLING *et al.*, 2006). A maior dificuldade nessa etapa é obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Os pré-tratamentos aplicados na planta matriz são determinantes para o sucesso dessa etapa de trabalho, principalmente no que se refere aos microorganismos endógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A propagação vegetativa *in vitro* vem-se destacando como ferramenta para a implantação de florestas clonais, substituindo-se as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos. Nesse sentido, a cultura de tecidos em espécies lenhosas vem ganhando grande impulso nas últimas décadas, sendo sua utilização rotineira em muitas empresas do ramo florestal, demonstrando ser uma ferramenta tecnológica viável para a produção de mudas de alto padrão genético, fisiológico e sanitário.

Muitos trabalhos, visando à micropropagação de espécies lenhosas, têm sido realizados, como com *Eucalyptus grandis* (SITA, 1986); *Pinus patula* (McKELLAR *et al.*, 1994); *Swietenia macrophylla* (ROCHA; QUOIRIN, 2004), entre vários outros.

Com o objetivo de contribuir para os esforços relacionados à exploração sustentável de espécies florestais nativas, e mais especificamente *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) e *Peltophorum dubium* (canafístula) a partir do conhecimento de sua propagação *in vitro* e da diversidade genética de populações naturais estudos desta natureza se fazem necessários e são desenvolvidos pela equipe do Núcleo em Biotecnologia e Melhoramento da UFSM.

2.2 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS

2.2.1 Canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.)

Peltophorum dubium pertencente à família Caesalpinaceae, é também conhecida popularmente por canafístula, farinha-seca, faveira, sobrasil, tamboril-bravo, guarucaia, ibirá-puitá é uma planta rústica e de rápido crescimento, é comumente encontrada colonizando pastagens, ocupando clareiras e bordas de matas, sendo também utilizada para a composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente. Espécie frequente em todo o domínio da floresta estacional semidecidual, abundante em formações secundárias, mas com poucos indivíduos, geralmente de grande porte, ocupando o estrato dominante do dossel em floresta primária.

A árvore pode ser empregada no paisagismo ornamental quando em florescimento e proporciona ótima sombra quando isolada. Suas flores são amarelas e encontram-se em vistosas panículas terminais, sendo indicada para a arborização de praças, parques e rodovias. A espécie apresenta extensa distribuição natural, desde a Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul até o Paraná (LORENZI, 1992; DURIGAN *et al.*, 1997 e MARCHIORI, 1997).

Desenvolve-se naturalmente em vários tipos de solo, sendo pouco exigente em relação à fertilização química apresentando um rápido crescimento e fácil adaptação (CARVALHO, 1994).

Em florestas nativas onde há sua ocorrência, geralmente, existem poucos indivíduos, porém, esses são sempre de grande porte, quase sempre ocupando o dossel dominante na floresta primária. Seu crescimento é limitado, sobretudo, por fortes geadas (CARVALHO, - 2003). Pode atingir de 15 a 25 metros de altura em sua fase adulta e apresentar um diâmetro a altura do peito (DAP) que varia de 35 a 90 cm. O fuste atinge até 15 metros de comprimento e a copa é ampla com folhas compostas, bipinadas, alternas (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008).

Sua madeira é utilizada em construções civis como vigas, ripas, marcos, portas, janelas, assoalhos; na indústria de móveis e na construção naval e militar – razões que a tornam uma espécie com destacado potencial silvicultural (CARVALHO, 1994). A espécie é muito recomendada para reflorestamento homogêneo (MARCHIORI, 1997). A ornamentação de áreas amplas é outra utilidade desta árvore devido a beleza de suas flores e as raízes bem desenvolvidas, o que evita seu tombamento pelo vento (LORENZI, 2008).



Fotos: Paulo Ernani Ramalho Carvalho

2.2.2 Açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius & Zucarini)

Luehea divaricata integrante da família Malvaceae (SOBRAL *et al.*, 2006), popularmente conhecida em diferentes regiões do Brasil como açoita-cavalo, estriveira, ivitinga, ivatingui, salta-cavalo, soita-cavalo, açoita-cavalo-vermelho, açoite-cavalo e saco-de-gambá, é uma espécie florestal com ampla distribuição geográfica, indicada para reflorestamentos. Árvore que desenvolve troncos com tronco geralmente tortuoso e nodoso de base alargada, quase retos e bastante altos, podendo atingir 20 a 25 m de altura e um diâmetro de 50 a 80 cm à altura do peito. Apresenta madeira moderadamente pesada, de cor clara, de boa trabalhabilidade e de acabamento delicado. A madeira, cerne de coloração marrom e avermelhado (RICHTER; DALLWITZ, 2009), é indicada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, por ser de baixa durabilidade natural e de boa permeabilidade ao tratamento preservativo (REITZ *et al.*, 1988).

De acordo com Lorenzi (1992), *L. divaricata* é uma planta pioneira de rápido crescimento que não pode faltar nos reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente. Reitz *et al.* (1988) atestaram que, considerando seu habitat natural e sua vitalidade como espécie pioneira e heliófita, é possível seu reflorestamento em campo aberto e em populações puras; contudo, é possível que, exposta à luz direta, sua ramificação se verifique de modo muito precoce, não desenvolvendo suficientemente o tronco e o fuste.

Possui diversos potenciais de uso, é muito útil em reflorestamentos de áreas de preservação permanente e para o enriquecimento de áreas degradadas, encostas abruptas e margens de rios, além de fins paisagísticos e arborização urbana (CARVALHO, 2003). As folhas de açoita-cavalo são utilizadas como fitoterápico, no combate à disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia (gonorreia) e tumores, a infusão das flores é empregada contra bronquite; já a raiz, é depurativa (TANAKA *et al.*, 2005). A madeira pode ser utilizada para produzir celulose e papel, sua casca fornece fibras, resina, mucilagens e tanino (BACKES; IRGANG, 2002).

Encontra-se distribuída no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, no Uruguai e no Brasil. Em território brasileiro abrange os estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e do Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008; CARVALHO, 1994).

O açoita-cavalo teve uma presença marcante na história do desenvolvimento da indústria madeireira no sul do Brasil, no entanto sua exploração ocorreu de forma descontrolada e extrativista, levando a redução drástica dos exemplares desta espécie. Atualmente é raro encontrar exemplares com boas características fenotípicas adequadas ao uso comercial. Há um crescente interesse do uso de *Luehea divaricata* em programas de reflorestamento e indústria madeireira, no entanto existe uma escassez de estudos sobre a propagação vegetativa desta espécie, e estudos relacionados a tal questão são uma alternativa promissora para solucionar o problema da produção de mudas desta espécie (FARIAS, 2006).



Fonte: Paulo Ernani Ramalho Carvalho (2008)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver conhecimentos teóricos e práticos sobre a aplicação de técnicas de cultura de tecidos, na propagação *in vitro* de espécies florestais nativas, assim como conhecer e acompanhar as atividades de rotina do Laboratório de Cultura de Tecidos, do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar e desenvolver atividades do laboratório de cultura de tecidos, bem como, os trabalhos científicos realizados com micropropagação de *Peltophorum dubium* e *Luehea divaricata*.
- Obter conhecimentos teóricos e práticos relacionados a técnicas de propagação vegetativa *in vitro* por meio de atividades práticas.
- Identificar as principais dependências, instalações e equipamentos utilizados num laboratório de cultura de tecidos vegetais.
- Conhecer a dinâmica de trabalho de um laboratório de cultura de tecidos, através da execução das atividades de rotina.
- Desenvolver e acompanhar as atividades de coleta de amostras de tecidos vegetais para fins de isolamento de DNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi realizado no período de abril à julho de 2013 no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, correspondendo a uma carga horária de 6 horas diárias e 30 horas semanais, completando carga horária mínima de 360 (trezentas e sessenta) horas, e algumas horas adicionais de trabalhos a campo e coleta de materiais para realização de atividades.

O Núcleo faz parte do Departamento de Fitotecnia, é coordenado pela Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger e utiliza a Biotecnologia aplicada ao Melhoramento Genético para a geração de conhecimentos, processos e produtos que contribuam para a solução de problemas específicos no contexto da agricultura, horticultura e produção florestal. Estudantes de graduação em Agronomia e Engenharia Florestal além de estudantes de pós-graduação utilizam os ambientes do Núcleo e desenvolvem as seguintes linhas de pesquisa:

- a) Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de germoplasma cujo objetivo é a aplicação e otimização de técnicas da cultura de tecidos visando à manutenção e à ampliação da variabilidade genética com utilização de marcadores moleculares na análise da diversidade genética.
- b) Obtenção, caracterização e avaliação de germoplasma vegetal que consiste na coleta, caracterização, conservação *in vivo* de germoplasma silvestre e cultivado e avaliação do germoplasma e identificação de genótipos com características de interesse.
- c) Manipulação genética e seleção de genótipos superiores cujo objetivo é a incorporação e seleção de caracteres agronômicos no germoplasma cultivado.

As atividades são desenvolvidas diariamente em salas de lavagem e esterilização (local destinado ao descarte de meios de cultura utilizados e outros resíduos, à lavagem de vidrarias, à autoclavagem de água, aos meios de cultura e a utensílios diversos), sala de preparo de meio de cultivo, área para manipulação asséptica (local onde exclusivamente são realizadas inoculações e transferências de material vegetal), área para incubação das culturas (local dotado de sistema de controle de temperatura, luz e umidade, no qual as culturas são mantidas até o momento de ser retiradas dos frascos), área para observação e avaliação das culturas (ambiente pequeno contendo bancada de trabalho para avaliações parciais ou finais de experimentos *in vitro*), almoxarifado (é nesse compartimento que são colocadas estantes ou prateleiras para guardar reagentes químicos e materiais diversos em estoque a ser

utilizados na rotina laboratorial), casa de vegetação, câmara de nebulização e telado (ambientes anexos ao laboratório, destinados à aclimação de plantas produzidas *in vitro*) e além do laboratório de marcadores moleculares (ambiente asséptico onde são feitas as extrações de DNA, géis e eletroforese).

4.2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

Durante o período de estágio houve o acompanhamento de todas as etapas que levam a propagação *in vitro* nos diferentes ambientes do laboratório que incluíram o preparo de meios de cultura e soluções estoque (MS e WPM), esterilização em autoclave do meio de cultura e materiais utilizados, preparo de solução com etanol para assepsia, inoculação de sementes e explantes em câmara de fluxo laminar, bem como a manutenção da limpeza de organização do laboratório.

Os pormenores de cada etapa serão apresentados no item Resultados e Discussão deste trabalho. A seguir será apresentada a metodologia empregada para a inoculação de sementes de *Peltophorum dubium* e de explantes de *Luehea divaricata*, espécies florestais nativas em estudo no laboratório, bem como o acompanhamento de atividades de coleta de amostras de tecidos vegetais para fins de isolamento de DNA.

4.2.1 Germinação de sementes de *Peltophorum dubium* em meio ágar-água

O objetivo do experimento foi promover a germinação de sementes para servirem como fonte de explantes. As sementes utilizadas foram coletadas na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS. No laboratório, ficaram armazenadas em frascos de vidro contendo sílica gel e acondicionadas sob temperatura de 8 a 10°C na geladeira até sua utilização nos experimentos, que vêm sendo realizados desde Janeiro de 2011.

Inicialmente calculou-se o número de sementes que seriam distribuídas para preparar a quantidade de meio nutritivo necessário, sempre contabilizando sementes a mais para o caso de perda durante a inoculação. Primeiramente, as sementes foram submetidas à superação de dormência por meio de escarificação mecânica com lixa Nº 100 na região oposta ao embrião (Figura 1). Em seguida, a desinfestação superficial foi realizada em câmara de fluxo laminar, com solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos e, posteriormente, as sementes foram submetidas a solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a

2,5% (v/v) durante 15 minutos, passando, então, por triplo enxágue em água destilada e autoclavada (Figura 2).



FIGURA 1 – A) Escarificação mecânica com lixa Nº 100 na região oposta ao embrião B) Frascos de vidro contendo sílica gel e sementes de *Peltophorum dubium* C) Semente escarificada.

Foi utilizado, como meio de cultivo das sementes, o ágar-água a 0,7% (p/v). As sementes foram inoculadas em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio previamente autoclavado, por um período de 40 minutos a 120°C e 1 atm de pressão. Em cada frasco foram inoculadas cinco sementes. Após, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16h/8h com escuro, intensidade luminosa de $20\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

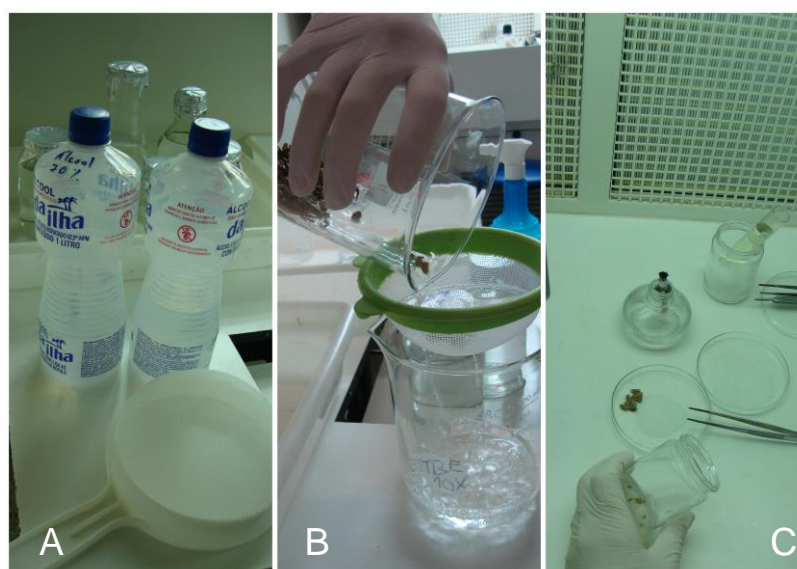


FIGURA 2 – A) Solução de etanol a 70% e água destilada e autoclavada; B) Triplo enxágue em água destilada e autoclavada ;C) Inoculação de sementes em meio de cultivo ágar-água a 0,7%.

4.2.2 Inoculação de explantes de *Luehea divaricata* provenientes de plântulas germinadas *in vitro* em meio WPM e MS com Ácido 3-Indolbutírico (AIB) na ausência e na presença de carvão ativado

O objetivo do experimento foi obter o enraizamento dos explantes de açoita-cavalo. Foram utilizados como explantes segmentos nodais que foram isolados das plântulas estabelecidas *in vitro*.

Foram utilizados os meios nutritivos WPM e MS, contendo 100 mgL^{-1} de mio-inositol, 30 gL^{-1} de sacarose, 7 gL^{-1} de ágar e acrescido diferentes concentrações do fitorregulador. Em 50% de cada tratamento foi adicionado 1 gL^{-1} de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar, os frascos foram vedados com papel alumínio e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado por 15 minutos a 120°C e a 1 atm de pressão.

Antes da inoculação, foi realizada a assepsia da câmara de fluxo laminar, com um algodão embebido em etanol a 70% (v/v) e após, todos os materiais usados na atividade foram colocados sobre a mesa, com a lâmpada germicida ligada durante 30 minutos. Os explantes foram inoculados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças previamente esterilizadas em autoclave, a 120°C e 1atm de pressão, durante 40 minutos.

Os segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e três segmentos por frasco. Após a inoculação, os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de $25\pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

4.2.3. Acompanhamento de atividades de coleta de amostras de tecidos vegetais para fins de isolamento de DNA

Folhas de *Luehea divaricata* foram coletadas na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), além do bairro do Cerrito na cidade de Santa Maria- RS e no município de Silveira Martins - RS. O material foi coletado diretamente das árvores e, logo após, receberam uma assepsia realizada com algodão hidrófilo, visando retirar a poeira existente sobre o material sendo, então, acondicionadas em sacos plásticos com fecho hermético devidamente identificado, contendo sílica em gel como agente desumidificante que, preserva características e propriedades originais até a utilização. Estes foram fechados procurando-se retirar o ar existente em seu interior e, em seguida, o material foi armazenado em gelo até a

chegada ao laboratório. O material foi mantido congelado em freezer (-20°C) até a realização das extrações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL

As atividades de cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico e com temperatura e iluminação controladas, visando, a otimização das respostas aos estímulos destes fatores para melhor crescimento das culturas. Elevado grau de assepsia é a condição limitante em qualquer situação já que fungos e bactérias encontram, no meio nutritivo e ambiente apropriado para seu crescimento acelerado, causando a morte das culturas ali contidas (TEIXEIRA; TORRES, 1998)

O ambiente ideal para instalação do laboratório de cultura de tecidos deve assegurar o máximo de isolamento do ambiente externo, a fim de evitar contaminantes que possam inviabilizar as culturas *in vitro*. Surge, portanto, a necessidade de uma instalação com características apropriadas e com equipamentos e normas de trabalho que possibilitem a criação de um ambiente com elevado nível de limpeza e assepsia.

As atividades de cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico a fim de evitar qualquer tipo de contaminação. Isto torna fundamental que sejam realizadas rotineiramente atividades relacionadas à limpeza e esterilização do material utilizado e dos meios de cultura. Estas atividades devem ser desenvolvidas na sala de limpeza e na sala de preparo do laboratório e incluindo a lavagem de vidraria, autoclavagem de água, de meios de cultura e de utensílios diversos e descarte de meios de cultura utilizados. Tais atividades são realizadas com o auxílio de equipamentos, como autoclave, destilador e estufa de secagem.

5.1.1. Esterilização em autoclave

Os frascos são levados para a esterilização do meio em autoclave, em temperatura de 120°C e 1 atm de pressão, por 15min. Na sequência, os frascos são retirados da autoclave, com o auxílio de luvas e são deixados resfriar à temperatura ambiente para que o meio geleifique e seja possível a inoculação dos explantes.

É relevante relatar que, além dos meios nutritivos, os instrumentos utilizados para inoculação como pinças, bisturis e placas de Petri, também, devem ser autoclavadas. De

maneira geral, esses instrumentos são autoclavados juntamente com os meios, embalados em jornal.

O procedimento de uso da autoclave inicia com a verificação do nível de água dentro da autoclave, este deve estar encostando na base de seu cesto, caso contrário o equipamento pode ser danificado. Após, o material a ser esterilizado é colocado dentro da autoclave, que é então fechada e ligada na posição máxima. No momento em que esta é fechada o registro de saída de vapor é aberto, este permanece assim até iniciar a saída de vapor pelo registro.

Com a saída intensa de vapor, é fechado o registro de saída para que possa subir a pressão cuidando o manômetro, que indica a pressão interna da autoclave, quando este subir até atingir a pressão de 1 atm a chave comutadora passa da posição máxima para a posição média, diminuindo a pressão interna. A partir daí é marcado o tempo de autoclavagem, dependendo do material a ser esterilizado. Após passado este tempo, a autoclave é desligada e o registro é aberto aos poucos, para evitar acidentes. No momento que não há mais vapor saindo da autoclave, ou seja, que a pressão chegou a 0 atm, esta é aberta e o material é retirado com o auxílio de luvas de amianto e bandeja.

A autoclave precisa de um tempo de 15 minutos para esterilizar meios nutritivos, após este procedimento o material é levado imediatamente para a sala de transferência. Para a esterilização de água destilada, utensílios como pinças e vidrarias e do material contaminado, são necessários 40 minutos na autoclave sob uma pressão média de 1 atm, a presença de fungos e bactérias torna a esterilização mais demorada, este tempo garante que tais microorganismos sejam eliminados, e os materiais podem utilizados novamente em outros procedimentos do laboratório.

Outra observação é a troca da água que fica dentro da autoclave. Após a esterilização de meios de cultura contaminados a água utilizada é retirada, e coloca-se água destilada. Este é um cuidado importante para evitar a contaminação do material que será colocado no autoclave, após a esterilização do material contaminado.

O material contaminado é descartado no lixo e os frascos lavados na sala de limpeza. Os demais materiais, como por exemplo, beckers e provetas, utilizados para o preparo de meios de cultura são lavados na sala de preparo de meios nutritivos. Após a lavagem todo o material é levado para a estufa de secagem, na sala de preparo. Esta funciona como um forno elétrico comum, que produz calor seco, muito eficiente na secagem rápida de vidrarias e demais utensílios que não sejam plásticos. A estufa é ligada a 50° C e permanece ligada até a completa secagem do material. Após esta sequência de procedimentos, o material é guardado em seu devido lugar.

A água utilizada para todas as atividades do laboratório de cultura de tecidos, exceto para as atividades relacionadas com a limpeza, é destilada pelo destilador. Este equipamento fica na sala de limpeza, e é utilizado para a eliminação dos sais minerais da água.

5.1.2. Preparo de etanol 70% (v/v) para assepsia

O etanol a 70% (v/v) é um desinfetante de média eficiência que apresenta boa ação germicida. Nessa concentração, o álcool não desidrata a parede celular do microorganismo, podendo penetrar no seu interior, onde irá desnaturar proteínas, fato que não ocorre quando se utiliza o álcool acima ou abaixo da concentração ideal. Dessa forma, o etanol a 70% (v/v) é utilizado em diversas atividades do laboratório de cultura de tecidos.

O processo de diluição de soluções de etanol é feito seguindo a fórmula:

$$\frac{\text{concentração desejada (\%)} \times \text{volume desejado (mL)}}{\text{concentração álcool na solução pura (\%)}} = \text{volume de solução pura (mL)}$$

Então,

Concentração desejada = 70%

Volume desejado = 1L (1000 mL)

Concentração de álcool na solução pura = 92,8%

$$\frac{70\% \times 1000 \text{ ml}}{92,8\%} = 754,3 \text{ mL}$$

Após este procedimento, coloca-se 754,3 mL de álcool etílico (92,8%) em uma proveta de 1000 mL, completando-se o restante do volume com água destilada. Em seguida, distribui-se o conteúdo em frascos devidamente identificados para uso nas diversas atividades do laboratório.

5.2 PREPARO DE MEIOS DE CULTURA WPM E MS

Os meios nutritivos utilizados para a germinação e crescimento *in vitro* devem fornecer as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas utilizadas pelas plantas *ex vitro*, são conservadas

no material vegetal *in vitro*. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998) e o estabelecimento de um meio nutritivo adequado para o material em estudo é de fundamental importância (SANTOS, 2003).

Para o início do preparo dos meios é realizado o cálculo da quantidade de meio nutritivo a ser preparado, a qual dependerá do número de explantes a ser inoculado, do número de tratamentos e repetições do experimento e do volume de meio nutritivo usado em cada frasco, geralmente usa-se 30 mL por frasco. Também, pesam-se os componentes adicionais ao meio, como, por exemplo, sacarose, ágar, mio-inositol e carvão ativado. Os meios nutritivos são preparados na sala de preparo, local destinado ao preparo dos meios nutritivos e, também outras soluções necessárias, como as soluções estoques, esta sala deve ser totalmente asséptica para evitar possíveis contaminações.

O preparo do meio nutritivo é uma das etapas que mais demandam tempo e, por isso, com a intenção de facilitar a rotina do laboratório são utilizadas soluções estoques concentradas para elaborar os meios nutritivos WPM e MS. No total, são utilizadas 8 soluções estoque que contém os macro, micronutrientes e vitaminas necessários para atender as necessidades da cultura *in vitro*. Essas soluções ficam estocadas na geladeira, em frascos opacos, do tipo âmbar, em uma concentração 100 vezes maior que a concentração final.

Para o preparo do meio MS, utilizam-se oito soluções estoque, sendo as soluções, A, B, C, D, E, F, G e H (Tabela 2). Desta maneira facilitam o trabalho, pois não é preciso prepará-las todas as vezes que será preparado um meio nutritivo (Figura 3).

TABELA 2- Relação e concentração das soluções-estoque do meio de cultura MS.

Solução-estoque	Componente	Concentração
Macronutrientes		
A	NH_4NO_3	165,0
B	KNO_3	190,0
C	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44,0
D	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,0
E	KH_2PO_4	17,0
Micronutrientes		
F	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,690
	H_3BO_3	0,620
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,860
	KI	0,083
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025
Fe.EDTA		
G	Fe.EDTA	
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,73
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78
Misturas orgânicas		
H	tiamina . HCl	0,01
	ácido nicotínico	0,05
	piridoxina . HCl	0,05
I	glicina	0,2
J	mio-inositol	10,0



FIGURA 3 - Soluções do meio MS e WPM

O meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS é diferenciado do meio MS somente pela concentração das soluções-estoque, sendo utilizada a metade da concentração, ou seja, 5 mL^{-1} . Para o meio WPM são utilizadas nove soluções, diferente do meio MS que são utilizadas oito soluções

(Tabela 1, pg. 13). As soluções do meio WPM são classificadas como A₁, A₂, B, C, D, E, F, G e H.

Para a elaboração de 1000 mL de meio MS são pipetados 10 mL de cada uma das soluções-estoque que são colocados em um Becker. O volume de cada solução deve ser retirado com pipeta, para obter uma maior precisão, utilizando-se sempre uma pipeta para cada frasco, a fim de evitar contaminação das soluções. Em balança analítica, são pesados 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, sendo a sacarose e o mio-inositol adicionados ao Becker com as soluções-estoque. Em seguida, é feito o ajuste do volume, para uma maior precisão, transferindo o conteúdo do Becker para uma proveta de 1000 mL, onde completa-se o restante com água destilada. Esse volume pode ser dividido conforme o número e os tratamentos usados. Quando utilizados outros componentes no meio, como vitaminas ou carvão ativado, a adição é feita juntamente com o mio-inositol e a sacarose, exceto o ágar que deve ser colocado por último, somente após a correção do pH.

Em seguida, o meio nutritivo é dividido de acordo com o número de tratamentos em questão e, então, pode-se acrescentar ao meio nutritivo os fitorreguladores, com auxílio de micropipetas, pois estes, geralmente, são utilizados em concentrações muito pequenas, na ordem de microlitros (µL). É importante que os fitorreguladores sejam guardados no congelador, desta maneira possuem uma maior durabilidade. Antes de usá-los devem ser descongelados, a temperatura ambiente. O procedimento de preparo do meio WPM é semelhante, adicionando-se apenas outras soluções.

Com o meio nutritivo preparado, o pH do meio é ajustado. O pH ideal dos meios nutritivos para cultivo *in vitro* de espécies arbóreas é 5,8. Inicialmente, o medidor de pH deve ser ligado meia hora antes do uso e as soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 precisam estar em temperatura ambiente, para então ser feita a calibragem do aparelho conforme o manual de instruções. Após este procedimento o pH pode ser medido e ajustado, inserindo o eletrodo no meio e aguardar a leitura, se esta não acusar um valor maior que 5,8 é utilizado HCl a 1M, já se o pH acusar um valor menor que 5,8 é utilizado NaOH a 0,3M, que é uma substância básica, portanto elevará o pH. Para homogeneizar a solução é usado um agitador magnético, que não deve entrar em contato com o eletrodo, visto que este é muito frágil e pode ser danificado quando em movimento com o agitador.

Por fim, o ágar, usado para geleificação do meio, é adicionado ao meio nutritivo após o ajuste do pH a 5,8. A consistência do meio depende da concentração de ágar utilizada, pois ele facilita a difusão dos nutrientes, do meio para o explante. Na sequência, a solução é levada ao microondas, para que ocorra o cozimento, em potência alta por aproximadamente 10 minutos, agitando no tempo intermediário. O meio estará pronto quando ocorrer uma leve fervura e o meio apresentar uma cor transparente. Após a fervura, com o auxílio de um Becker o meio é vertido nos frascos. Em seguida, é usado papel alumínio para vedar os frascos cuidadosamente para que eles não abram durante o processo de autoclavagem.

5.3 INOCULAÇÃO DE SEMENTES E EXPLANTES EM CÂMARA DE FLUXO LAMINAR

A câmara de fluxo laminar é um equipamento essencial no laboratório, pois ela força a passagem de ar por um filtro bacteriológico, criando um ambiente estéril com pressão positiva, que bloqueia a entrada do ar externo contaminado. Todas as atividades de manipulação do material vegetal são feitas na sala de transferência que deve estar sempre limpa e com um bom nível de assepsia.

A preparação da câmara de fluxo laminar tem por objetivo menor porcentagem de contaminação dos explantes. A limpeza da câmara é feita com algodão embebido de etanol 70% (v/v) antes do início das atividades e ao final de cada dia de trabalho. Os instrumentos utilizados para inoculação são pinças, bisturis, placas de Petri e ainda lamparinas e tubo de ensaio com etanol absoluto que é usado para a flambagem.

Para iniciar os trabalhos, esses materiais devem ser colocados na câmara sob exposição de lâmpada germicida ultravioleta por pelo menos 20 minutos, visando esterilizar o ambiente interno da câmara de fluxo. Nesse caso, ninguém deve permanecer no ambiente, as portas de acesso à sala de transferência são fechadas e um aviso é colocado na porta proibindo a entrada de pessoas na sala. Esse cuidado é necessário, pois a lâmpada germicida é extremamente nociva, podendo causar queimaduras e é altamente mutagênica.

Todos os procedimentos desempenhados na mesa de fluxo laminar são feitos com o uso de jaleco, máscara e luvas para evitar a contaminação do material. A fonte de explante deve ser seccionada e transferida para o meio nutritivo. As atividades de inoculações devem ser feitas por mão-de-obra especializada, precisam ser rápidas e a manipulação do explante requer precisão para evitar a desidratação dos tecidos vegetais. Devem ser usadas várias pinças, para que o uso seja alternado, permitindo que eles esfriem após a flambagem. Se a

fonte de explante não é originada de plântulas germinadas *in vitro*, como no caso de sementes ou brotações, é realizada a desinfestação superficial antes da inoculação.

5.4 OUTRAS ATIVIDADES

Diariamente, os integrantes do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia avaliam e monitoram o crescimento das plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, auxiliando aos pós-graduandos em vários experimentos desenvolvidos no laboratório, como o preparo de experimentos com meios nutritivos e as avaliações periódicas dos trabalhos com o objetivo de verificar os avanços das pesquisas, além de limpeza do material utilizado em experimentos, adubação e rega das plantas que estão se desenvolvendo em estufa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste estágio foi possível acompanhar a dinâmica de trabalho em um laboratório de pesquisa em cultura de tecidos. Através da realização dos experimentos desenvolvidos, foi possível compreender a importância das atividades de rotina do laboratório e entender os procedimentos para o manuseio dos equipamentos utilizados nos trabalhos do laboratório.

Além da preparação técnica e profissional, este estágio proporcionou um crescimento pessoal através do trabalho em equipe, com pessoas especializadas, respeitando as diferenças e maneiras de cada pessoa trabalhar, sendo isto, fundamental para o sucesso da futura atuação profissional. Portanto, pode-se afirmar que a experiência do estágio vai muito além da aplicação técnica e prática dos conhecimentos adquiridos no curso. Consiste em uma oportunidade de preparação para uma nova etapa profissional.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais: produção de alcalóides e óleos essenciais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, n.30, p.55-59, 2003.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 261 – 296, 1998.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: Guia de Identificação & Interesse Ecológico**. [S.l.: s.n.], p. 326, 2002.
- BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)]**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.
- BONGA, J. M.; ADERKAS. ***In vitro* culture of trees**. Boston: Kluwer Academic Publishers, v. 2, 1992.
- BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, . v. 3, 1985.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA – CNPF; Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: EMBRAPA Florestas, 2002. (Circular Técnica 64)
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Colombo: EMBRAPA Florestas, v. 1, 2008. (Circular Técnica, 147)
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo, PR: EMBRAPA FLORESTAS, 2003.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 3 ed. Nex York: Cambridge University Press, p. 256, 1995.
- FARIAS, J. A. **Contribuição para a silvicultura de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (açoita-cavalo)**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.
- 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, EMBRAPA, . v. 1, p. 183 – 260, 1998.

- HARTMANN, H.T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7 ed, Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, p. 847, 2002.
- HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, p. 216-220, 1980.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, p. 117-227, 1983.
- HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.) **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 15-53, 2000.
- JAIN, S. M. Biotechnology of industrially important tree species in developing countries. In: WATANABE, K. N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin, Texas, U.S.A.: Academic Press, p. 227 – 238, 1997.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, p. 368, 1992.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5 ed, vol. 1, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- MANTOVANI, N.C.;FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM/CEPEF, p.123, 1998.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: UFSM, 1997.
- McKELLAR, D. S.; HERMAN, B.; WATT, M. P. Towards a Protocol for the Micropropagation of *Pinus patula*. **Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif**, n. 171, 1994.
- MURALIDHARAN, E.M.; KALLARACKAL, J. Current trends in Forest tree biotechnology. In: SRIVASTAVA, P.S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Eds.). **Plant biotechnology and molecular markers**. New Delhi: Anamaya publishers, p. 169 – 182, 2004.
- PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 40, 1995.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Herbário Barbosa Rodrigues; Secretaria da Agricultura e Abastecimento-DRNR, p.525, 1988.
- ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese de mogno (*Swietenia macrophylla* King.) cultivados *in vitro*. **Ciência florestal**, Santa Maria, RS, v. 14, n.1, p. 91 – 101, 2004.

- SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 13, 2000.
- SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; CERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Rio Grande do Sul: UFRGS, p. 415-444, 2003.
- SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Fatos e números do Brasil florestal**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, p.109, 2007.
- SITA, G. L. Progress towards the *in vitro* clonal propagation of *Eucalyptus grandis*. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. Butterworths: Cambridge, p. 159 – 186, 1986.
- SKOOG, F.; MILLER, O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- SMITH, J. **Micropropagation of the Gynea Lily**: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston: RIRDC, p. 59, 2000.
- STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p. 167-178, 2003.
- SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Paulo: Rima/Novo Ambiente, p. 350, 2006.
- SOUZA, C. M.; PINTO J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, p. 830-835, 1999.
- SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 152, 2006.
- TANAKA, J. et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834 – 837, 2005.
- TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ. v. 1, p. 71-86, 1998.
- TORRES, A.C. et al. Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa-CENARGEN, p. 20, 2001.
- VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. **Advances in Genetics**. v 20, p.127–215, 1979.
- WATANABE, K. N.; RAMAN, K.V. Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. In: WATANABE, K. N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant**

genetic resources for sustainability and productivity. Austin, Texas, U.S.A.: Academic Press, p. 1 – 13, 1997.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Colombo: Embrapa Florestas, p. 55, 2006.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa. Editora Universidade Federal de Viçosa. 2009.

ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In : BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry.** 2 ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 231-255, 1985.