

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Gypsophila paniculata*

RAÍSA LEMOS PEDROTTI¹; ANDRIELE BONEMANNMADRUGA¹,
GUILHERME GARCIA GOVEA¹, DAIANE BENEMANN²

¹ Estagiários da empresa BioPlant Tech, incubada na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS- raisapedrotti@hotmail.com; bonemannmadruga@gmail.com; guilhermegovea1@gmail.com

² Sócia proprietária da empresa BioPlant Tech, incubada na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos além de desenvolver linhas de pesquisas de caráter básico ligadas à fisiologia de plantas, bioquímica, genética etc, também desenvolve protocolos de micropropagação de plantas elite para o agronegócio visando produção de alimentos, fibras e energia (ex. cana/álcool), tudo isso, dentro de um contexto de desafios e novas expectativas em relação a uma população mundial cada vez mais ávida de 'input' para dar suporte a uma taxa de incremento populacional cada vez mais desenfreada e aterradora (SINCLAIR; GARDNER, 1998).

Este panorama nos conduz então, a um agronegócio que precisa pautar-se por melhores e novas tecnologias, para aumentar as safras agrícolas, diminuir custos de produção, reduzir a dependência externa de tecnologia, enfim, aumentar a eficiência do setor. Nesse sentido, a cultura de tecidos de plantas tem um importante papel a desempenhar pois, de seus protocolos devem surgir plantas mais uniformes, produtivas e livres de toda classe de patógeno (CID; ZIMMERMANN, 2006).

Porém a clonagem de plantas a partir de explantes oriundos do campo, oferece dificuldades prática não sempre fácil de sobrepôr, como por exemplo, assepsia dos explante é uma delas. O estabelecimento in vitro dos explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropropagação, iniciando-se com a seleção dos explantes mais adequados para a subsequente multiplicação e terminando com a obtenção de uma cultura suficientemente adaptada às condições in vitro (CID; ZIMMERMANN, 2006).

As ornamentais são, por excelência, o grupo de plantas em que a aplicação da micropropagação teve uma expressão significativa no mundo científico e tecnológico, com repercussão direta na economia. O incentivo para esse crescimento, fundamenta-se no alto valor agregado ao produto final (CAPELLADES-QUERALT et al., 1993). Neste contexto, inclui-se a *Gypsophila paniculata*; uma flor de corte de grande importância na floricultura comercial, por ser um dos componentes principais na confecção de arranjos.

A gypsophila pode ser propagada vegetativamente ou através de sementes. O método usual de propagação no Brasil, é a vegetativa através de estaquia apical. A propagação por sementes torna-se onerosa pois as mesmas são todas importadas. No entanto, esta forma de propagação apresenta algumas dificuldades, pois requer uma boa infraestrutura como casa de vegetação, assepsia no manejo do material vegetativo, além de ser um processo demorado. Estes fatores fazem da propagação in vitro uma alternativa vantajosa em relação a propagação tradicional (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O experimento teve como objetivo obter um protocolo de assepsia para *Gypsophila paniculata in vitro*.

2. METODOLOGIA

Os dois experimentos que compõem este trabalho foram realizados na empresa BioPlant Tech, incubada na Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

Utilizou-se como explantes segmentos nodais de mudas de *Gypsophila paniculata*, as quais foram mantidas em vasos em casa de vegetação.

No experimento I, segmentos nodais, após a excisão, foram submetidos a um processo de assepsia mediante a imersão em álcool 70% (1 minuto) seguido por uma imersão em solução aquosa por 15 min. Os tratamentos foram: I- solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 2%; II- solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 2% com pré-tratamento (PT); III- solução de NaOCl 2% e IV- solução de NaOCl 2% com pré-tratamento (PT). Após imersão em solução, o material vegetal foi lavado três vezes em água destilada e autoclavada. A desinfestação foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. O pré-tratamento consistiu em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com metade das concentrações de nitrato de amônio de nitrato de potássio, 30g/L de sacarose, 100mg/L de mio-inositol, sem adição de ágar (meio líquido), sob agitação por 90 min. A desinfestação foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

No experimento II, as gemas axilares, após a excisão, foram submetidas a um processo de assepsia mediante a imersão em álcool 70% (1 minuto) seguido por uma imersão em solução aquosa de NaOCl 2% por 15 min (tratamento I), 20 min (tratamento II), 25 min (tratamento III) e 30 min (tratamento IV).

Após o processo de assepsia, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS/2 com metade das concentrações de sais e vitaminas, contendo 30g/L de sacarose, 100mg/L de mio-inositol e 7 g/L de ágar.

Para ambos experimentos, o pH foi ajustado para 5,8, antes da colocação do ágar e da esterilização do meio, realizada por autoclavagem por 20 minutos a 120°C e 1,5 atm. Após a inoculação de todo material, o mesmo foi transferido para câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 23 ± 2 °C. Aos 21 dias de cultivo foram avaliadas a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana e sobreviventes. Os tubos que apresentaram contaminação, após registro, foram eliminados. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 3 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída de 15 explantes (15 tubos), totalizando 45 explantes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro, através do uso do Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

A contaminação fúngica dos explantes foi maior no tratamento IV, oriundos da assepsia com hipoclorito de sódio 2% com PT (22%), porém este não diferiu dos demais. Em relação a contaminação bacteriana, esta foi maior no tratamento I (42,3%), diferindo estatisticamente do restante e as menores médias nos tratamentos II (15%) e IV (15%). A contaminação bacteriana interfere negativamente no estabelecimento de explantes *in vitro*. As bactérias constituem o mais comum e problemático tipo de contaminação por microrganismos em cultura de tecidos porque

podem ser sistêmicas e sua detecção muitas vezes é difícil (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para porcentagem de sobrevivência dos explantes (indicada pela coloração verde do explante), obteve-se 68% e 64% aos 21 dias de cultivo in vitro, nos tratamentos III e II, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre eles e ambos diferindo do restante. Os dados do experimento I estão descritos na Tabela 1.

A maior porcentagem de explantes sobreviventes e conseqüentemente estabelecidos in vitro para posterior multiplicação foram oriundos dos tratamentos com hipoclorito de cálcio com pré-tratamento e hipoclorito de sódio. Estudos indicam que o hipoclorito de cálcio é menos tóxico aos tecidos do que o hipoclorito de sódio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação por fungo e bactéria e sobrevivência de explantes de *Gypsophila paniculata*, submetidos a diferentes soluções de assepsia.

Tratamentos	Fungo	Bactéria	Sobreviventes
Hipoclorito de cálcio 2%	10,0 A	42,3 A	47,0 B
Hipoclorito de cálcio 2% + PT	20,0 A	15,0 C	64,0 A
Hipoclorito de sódio 2%	15,0 A	15,0 C	68,0 A
Hipoclorito de sódio 2% + PT	22,0 A	28,6 B	47,0 B

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Experimento II

Da mesma forma que o observado no experimento I, a contaminação dos explantes não se mostraram como problemas sérios ao estabelecimento in vitro. A contaminação fúngica foi maior em explantes oriundos do tratamento I (11%), porém não houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo os tratamentos II e III (7% para ambos) os que apresentaram menor porcentagem. A contaminação bacteriana foi maior no tratamento III (24,3%), diferindo estatisticamente somente I (9%). A sobrevivência dos explantes foi maior no tratamento I (80%), diferindo estatisticamente somente do tratamento III (66%). Os dados do experimento I estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de explantes de *Gypsophila paniculata*, com fungo, bactéria e sobreviventes, submetidos ao hipoclorito de sódio (2%) em diferentes tempos de imersão.

Tratamentos	Fungo	Bactéria	Sobreviventes
15 min	11 A	9 B	80 A
20 min	7 A	18 AB	75 AB
25 min	7 A	24 A	69 AB
30 min	9 A	20 A	71 A

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

De acordo com os resultados, pode-se dizer que a desinfestação com o hipoclorito de sódio por 15 min foi efetiva, uma vez que, ocorreu pouca contaminação por microrganismos (fungos e bactérias) nas plântulas em cultivo. Segundo MUNIZ et al. (2007), o hipoclorito de sódio apresenta eficiência na redução de microrganismos associados superficialmente as mesmas. O mecanismo de ação do cloro ativo, substância encontrada no hipoclorito de sódio, não é bem conhecido, embora, algumas hipóteses surgiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microrganismos, assim formando compostos tóxicos elevando a inibição das enzimas essenciais.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os dados analisados pode-se concluir que o hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos foi mais eficiente na assepsia de *Gypsophila paniculata* para estabelecimento e posterior multiplicação *in vitro*, pois apresentou menores porcentagens de contaminação bacteriana, fúngica e maior porcentagem de sobreviventes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAPELLADES-QUERALT, M.M.; BERUTO, A. VANDERSCHAEGHE, P.C. 1993. Ornamentals. p. 215-230. In P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.) **Micropropagation: Technology and Application**. Kluwer Academic Publishers, London.
- CID, L.P.B; ZIMMERMANN J. **A contaminação in vitro de plantas**. Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20.p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Editor). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ Embrapa-CNPq, 1990. p.99-169.
- GRATTAPAGLIA D; MACHADO M.A. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica/Embrapa Hortaliças. 1998. p. 183-260.
- MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows** - versão 2.0. Pelotas, 2002.
- MUNIZ, M. F. B.; SILVA, L. M.; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n.1, p. 140-146, 2007.
- SINCLAIR, T. R.; GARDNER, F.P. **Principles of Ecology in plant production**. New York: CAB International, 1998. p. 1-17.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.