

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Limonium latifolium*

RAÍSA LEMOS PEDROTTI¹; ANDRIELE BONEMANN MADRUGA¹, 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

²Sócia proprietária da empresa BioPlant Tech, incubada na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS-daiane_bio@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A micropopulação é uma técnica que permite produzir material em larga escala, em curto espaço de tempo e com valor sanitário superior, em relação ao material obtido por técnicas convencionais como propagação vegetativa e estacaia. Porém, uma das maiores dificuldades no estabelecimento *in vitro* está na obtenção de tecidos livres de contaminação por fungos e bactérias. O uso de agentes germicidas (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio), são fundamentais para a redução da contaminação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O estabelecimento *in vitro* dos explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropopulação, 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 micropopulação 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 o *Limonium latifolium*, popularmente conhecido como latifólia, uma flor de corte de importância na floricultura comercial, por ser um dos componentes principais na confecção de arranjos.

No Rio Grande do Sul, o cultivo comercial de latifólia teve início na década de 80 por imigrantes japoneses. Apesar do volume de comercialização ainda pequeno, se comparado com as demais flores de corte, o alto valor comercial da inflorescência e o relativo baixo custo de produção justificam seu cultivo. A reprodução sexuada de latifólia é viável, mas não é satisfatória sob o ponto de vista económico. As sementes apresentam germinação deficiente e geram plantas geneticamente segregantes. A produção eficiente de lotes homogéneos exige propagação clonal *in vitro* e, assim, o produtor encontra dificuldades na obtenção de mudas (FIOR et al., 2000).

O experimento teve como objetivo obter um protocolo de assepsia para *Limonium latifolium 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 *Limonium latifolium*, as quais foram mantidas em vasos em casa de vegetação.

No experimento I, os 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 Ca(ClO)₂ 2%; II- solução de Ca(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, 30gL de sacarose, 100mgL 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 20 min (tratamento I), 25 min (tratamento II), 30 min (tratamento III), 35 min (tratamento IV) e 40 min (tratamento V).

Após o processo de assepsia, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 30gL de sacarose, 100mgL de mio-inositol, 0,5 mgL⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 7 gL 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, bacteriana, oxidados (somente no experimento I) 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 33 explantes (33 tubos), totalizando 99 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 III, oriundos da assepsia com hipoclorito de cálcio 2% (20%), diferindo estatisticamente somente do tratamento I (9%). Em relação a contaminação bacteriana, esta foi maior no tratamento I (7%), diferindo estatisticamente somente do tratamento III (0%) e não do restante. 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). Em relação a porcentagem de sobreviventes, o tratamento I apresentou maior

média (84%), diferindo dos tratamentos II e IV (77 e 74%, respectivamente).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação por fungo e bactéria e sobrevivencia de explantes de *Limonium latifolium*, submetidos a diferentes soluções de assepsia (15 min).

Tratamentos	Fungo	Bactéria	Sobrevidentes
Hipoclorito de sódio 2%	9 B	7 A	84 A
Hipoclorito de sódio 2% + PT	18 A	5 A	77 BC
Hipoclorito de cálcio 2%	20 A	0 B	80 AB
Hipoclorito de cálcio 2% + PT	21 A	5 A	74 C

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

Experimento II

A contaminação fúngica foi maior em explantes oriundos do tratamento I (14%), diferindo estatisticamente do restante. Em relação a contaminação bacteriana, o tratamento I apresentou maior porcentagem (16%), diferindo estatisticamente do restante. A oxidação foi maior nos explantes oriundos do tratamento V (45%), diferindo dos tratamentos I, II e III (10, 20 e 24 %, respectivamente). A sobrevivência dos explantes foi maior no tratamento II (62%), diferindo estatisticamente somente dos tratamentos IV e V (49%). Os dados do experimento I estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de explantes de *Limonium latifolium*, com fungo, bactéria e sobrevidentes, submetidos ao hipoclorito de sódio (2%) em diferentes tempos de imersão.

Tratamento	Fungo	Bactéria	Oxidados	Sobrevidentes
20 min	14 A	16 A	10 C	60 A
25 min	10 B	8 B	20 B	62 A
30 min	7 BC	8 B	24 B	61 AB
35 min	6 BC	5 BC	40 A	49 B
40 min	3 C	3 C	45 A	49 B

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. A diferença da porcentagem de plantas sobrevidentes entre os dois experimentos, utilizando hipoclorito de sódio 2%, pode ser devido as condições fitossanitárias da planta matriz na casa de vegetação. Segundo MUNIZ et al. (2007), o hipoclorito de sódio apresenta eficiência na redução de microorganismos 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 microorganismos, 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 *Limonium latifolium* 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).
- Fior. C.S.; Rodrigues. L.R.; Kämpf, A.N. **In vitro propagation of Limonium latifolium Kuntze (Plumbaginaceae)**. Cienc. Rural vol.30, p35-39, 2000.
- GRATTAPAGLIA D MACHADO M.A. Micropropagação. In: TORRES AC; CAL- DAS 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.
- 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.