



Título da Pesquisa: Estabelecimento *in vitro* de lichia

Palavras-chave: Biotecnologia, Estabelecimento, Meio nutritivo, Explante

Campus: Bambuí- Minas Gerais

Tipo de Bolsa: PIBIC

Financiador: CNPq

Bolsista (as): Camila Lopes de Souza, Bruna Gonçalves Dias Reis

Professor Orientador: Nayara Penoni; Ricardo Monteiro Corrêa

Área de Conhecimento: Biotecnologia

RESUMO:

As pesquisas em torno da lichiera têm sido intensificadas nos últimos anos. No entanto, o Brasil, apesar da potencialidade de exploração comercial da cultura, os poucos estudos realizados centralizam-se nos frutos(pós-colheita) e não na planta como um todo. Neste contexto a biotecnologia é uma ferramenta com grande potencial para aprimorar a propagação desta cultura. Foram realizados ensaios conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFMG- Campus Bambuí, com o objetivo de estabelecer a lichia *in vitro*. No primeiro ensaio foram utilizadas partes vegetativas da planta matriz como gemas axilares, segmentos nodais e internodais. No segundo ensaio foram utilizadas sementes para o estabelecimento. Os frutos de lichia foram colhidos em dezembro e foram inoculados em frascos de 270 ml contendo 15 ml de meio de cultura. O estabelecimento utilizando segmento nodal e meio MS foi o mais eficiente na indução de calos. As sementes não germinaram *in vitro* devido a alta contaminação. Não foram obtidos plântulas, apenas calos evidenciando a necessidade de novos ensaios contendo reguladores de crescimento como a cinetina ou BAP.

INTRODUÇÃO:

A biotecnologia pode ser definida como um conjunto de técnicas de manipulação de seres vivos ou parte destes para fins econômicos. Esse conceito amplo inclui técnicas que são utilizadas em grande escala na agricultura desde o início do século XX, como a cultura de tecidos, a fixação biológica de nitrogênio e o controle biológico de pragas.

A propagação *in vitro* de plantas, chamada também de micropropagação, é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂.

As atividades de cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico e com temperatura e iluminação controladas, visando, principalmente, a otimização das respostas aos estímulos- termo e fotoperiódico aplicados ao material *in vitro*, além de outros fatores. Para a realização de algumas técnicas, a padronização de temperaturas e iluminação não se torna imprescindível, mas, em outros casos, condições ambientais inadequadas podem inviabilizar as respostas, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo. Além disso, o estabelecimento de condições ambientais ótimas proporciona melhor crescimento das culturas e as conseqüentes vantagens econômicas.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, 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*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, como algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro*.

A lichia, originária do Sul da China, pertence à família Sapindaceae e requer clima seco e frio no inverno, antes do florescimento, e quente e úmido no resto do ano. (Boletim, IAC, 200, 1998).

As pesquisas em torno da licheira têm sido intensificadas nos últimos anos. No entanto, o Brasil, apesar da potencialidade de exploração comercial da cultura, os poucos estudos realizados centralizam-se nos frutos (pós-colheita) e não na planta como um todo (Pereira1999).

Porém, como entrave à disseminação no Brasil pode- se considerar a falta de oferta de mudas no mercado, o alto preço da fruta no varejo, além da falta de estudos sobre seu comportamento, desenvolvimento e aspectos econômicos, sendo que o entendimento atual ainda é baseado em informações obtidas de outros países o que não pode representar a realidade local (Martins,1998). Além disso, os tradicionais métodos de propagação que são alporquia e as sementes são pouco eficientes por esgotar a planta mãe e induzir longo período juvenil, respectivamente.

Especificamente com *L. chinensis*, poucos trabalhos foram encontrados na literatura visando propagar via cultura de tecidos essa espécie, como os de Yu (1991), *Kantharajah et al.*,(1992), *Leonel et al.*,(1994), *Kantharajah et al.*,(1997), Mesquita(1999), mas com poucas respostas. O objetivo deste trabalho foi estabelecer *in vitro* explantes de lichia via segmentos nodais, internodais e sementes.

Portanto, a iniciativa desse projeto visa melhorar a cadeia produtiva de lichia e servir de apoio ao fortalecimento da fruticultura regional no centro oeste mineiro.

METODOLOGIA:

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFMG-Campus Bambuí.

As matrizes doadoras dos explantes foram plantas adultas de lichia da cultivar “Bengal” com aproximadamente 8 anos de idade que se encontram estabelecidas no setor de fruticultura do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí.

I- Estabelecimento via segmentos nodais e internodais

Os segmentos nodais e internodais foram coletados de plantas matrizes previamente pulverizadas com fungicidas. Em seguida foram levadas para o laboratório, deixadas em água corrente por 1 hora e posteriormente desinfetadas com solução de hipoclorito comercial(30%). Depois foram lavadas por 3 vezes em água destilada. O delineamento foi inteiramente casualizado com 8 tratamentos com 6 repetições sendo cada parcela experimental composta por 4 frascos. As avaliações foram feitas aos 30,60 e 90 dias após serem inoculadas.

Tabela 1: Meios de cultivo e explantes no estabelecimento in vitro de Lichia. IFMG-Bambuí. 2014.

Tratamentos	Meio nutritivo	Explante
1	MS*	Segmento internodal
2	MS*	segmento nodal
3	MS/2*	Segmento internodal
4	MS/2*	segmento nodal
5	MS/4*	Segmento internodal
6	MS/4*	segmento nodal
7	WPM**	Segmento internodal
8	WPM**	segmento nodal

•3% de sacarose adicionado ao meio de cultura; ** 2% de sacarose adicionado ao meio de cultura.

•II- Estabelecimento in vitro via germinação de sementes

•O segundo ensaio visou obter plântulas in vitro a partir de sementes de lichia. Os frutos de lichia foram colhidos na época de dezembro. As sementes de lichia perdem a viabilidade rapidamente, por isso os frutos coletados e armazenados em uma caixa de isopor onde ficaram até o processo de inoculação.

Os explantes foram inoculados em frascos de 270 ml contendo 15 ml de meio de conforme os tratamentos (Tabela 1).

O delineamento foi inteiramente casualizado, contendo 16 tratamentos com 4 repetições sendo cada parcela experimental composta por 4 frascos.

Nos dois ensaios, os explantes após inoculados foram colocados em solo de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz.

Após 30 dias foram feitas as primeiras avaliações das seguintes variáveis: percentagem de calos e percentagem de contaminação.

Tabela 2: Meios de cultivo e sacarose na germinação de sementes *in vitro* de Lichia. IFMG-Bambuú. 2014.

Tratamentos	Meio nutritivo	Sacarose (g L-1)
1	MS	0
2	MS	10
3	MS	20
4	MS	30
5	MS/2	0
6	MS/2	10
7	MS/2	20
8	MS/2	30
9	MS/4	0
10	MS/4	10
11	MS/4	20
12	MS/4	30
13	WPM	0
14	WPM	10
15	WPM	20
16	WPM	30

•Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Sisvar(Ferreira, 2000)

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Observou-se na tabela 3 que o meio MS com segmento nodal proporcionou maior formação de calo aos 30 dias. Em contra partida, os meios MS/2 e o WPM ambos com segmento internodal não proporcionaram formação dos mesmos.

Houve diferença significativa para formação de calo nos meios, MS, WPM e MS/2.

Aos 60 e 90 dias todos os meios com explante segmento nodal proporcionaram maior formação de calos. Já com os seguimentos internodais não houve presença de calos.

Nas avaliações para contaminação no período de 30, 60 e 90 dias, não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos.

Na inoculação de sementes, foram seguidos todos os processos para desinfestação das mesmas. Porém, com dois dias após a inoculação 100% dos fracos com as sementes haviam sido contaminados, o que paralisou a continuação da etapa. Foi utilizada solução de hipoclorito (30%) durante 20 minutos, mais tal quantidade não foi suficiente para a desinfestação superficial das mesmas, o que proporcionou o aparecimento de fungos.

Tabela 3: Percentagem de calos e de contaminação em explantes de Lichia em diferentes explantes e meios de cultura- IFMG-Bambuú 2014.

Meio	Explante	calo 30 dias	calo 60 dias	calo 90 dias	contam. 30 dias	contam. 60 dias	contam. 90 dias
MS*	Segmento intermodal	0% c	0% c	0% b	0% a	0% a	0% a
MS	segmento nodal	83,25% a	83,34% a	83,34% a	0% a	0% a	16,67% a
MS/2	Segmento intermodal	0% c	0% c	0% b	0% a	0% a	0% a
MS/2	segmento nodal	50% b	66,67% b	66,67% a	16,67% a	0% a	0% a
MS/4	Segmento intermodal	16,67% c	16,67% c	16,67% b	0% a	0% a	0% a
MS/4	segmento nodal	83,34% b	83,34% b	66,67% a	0% a	0% a	0% a
WPM	Segmento intermodal	0% c	0% c	0% b	0% a	0% a	0% a
WPM	segmento nodal	33,34% b	16,67% b	33,34% a	16,67% a	16,67% a	16,67% a

• Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo ensaio, observou-se que todas as sementes tiveram contaminação por fungos não permitindo a avaliação das mesmas.

CONCLUSÕES:

Os segmentos nodais inoculados no meio de cultivo MS proporcionou maior formação de calo no estabelecimento *in vitro* de lichia.

Os ensaios foram bem conduzidos sendo que o índice de contaminação foi muito baixo. Novos estudos serão conduzidos visando repetir o ensaio de germinação *in vitro* e outros ensaios como micropropagação e embriogênese somática.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

ALMEIDA, J.R. *et al.* Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus Dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. Revistas eletrônicas, PUC-RS. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/viewFile/3701/2845> acesso em: 11/11/13.

BASSAN, J.S. *et al.* OXIDAÇÃO FENÓLICA, TIPO DE EXPLANTE E MEIOS DE CULTURA NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE CANAFÍSTULA (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB). Ciência Florestal, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390. 2006. Disponível em: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/cienciaflorestal/article/view/1919/1161> acesso em: 09/11/13.

BRUNETTA, J.M.F.C. *et al.* Calôgenese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminapurina e ácido α -naftalenoacético. Scientia Forestalis n.71, p.19-24, Agosto 2006. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr71/cap02.pdf>, acesso em: 10/11/13.

CASTRO, L.A.S, OLIVEIRA, R.P. Sistemas de produção da batata doce. Texto disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/SistemaProducaoBatata-doce/cultura.htm> EMBRAPA, acesso em: 11/10/2103.

CID, L. P. B. **A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v.2, n. 25, 2000.

CORDER, M.P.M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Ciência Florestal**, v.9, n.2, p.1-7, 1999.

GOLLE, D.P. *et al.* Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* dc.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, jan.-mar. 2012. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?cf12019>, acesso em: 10/11/13

GOMES, G. A. C. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. Dissertação de Mestrado (Área de concentração: Fisiologia Vegetal). 92p. 1999.

KANTHARAJAH, A. S.; MCCONCHIE, C. A.; DODD, W. A. In vitro embryo culture and induction of multiple shoots in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Annals-of-Botany*. Brisbane, Australia. v. 70, n.2, p.153-156. 1992.

MANTOVANI, N.C. *et al.* Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (vellozo) arrabida ex Steudel). Ciência Florestal, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101. Disponível em : https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&ved=0CFcQFjAE&url=http%3A%2F%2Fcasavel.ufsm.br%2Frevistas%2Ffojs2.2.2%2Findex.php%2Fcienciaflorestal%2Farticle%2Fdownload%2F1658%2F943&ei=42uBUoPRKfez4AP2u4HYBA&usq=AFQjCNFiQsWqlKZ7kClwUpgBkd9q3bo99g&sig2=IWZ57ffWOAr6QtjMIW_qeQ&bvm=bv.56146854,d.dmg acesso em: 11/11/13.

MARTINS, A.B.G. Enraizamento de estacas enfolhadas de três variedades de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 100p. 1998.

MESQUITA, A. C. Estabelecimento *in vitro* de lichieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. Dissertação de Mestrado (Área de concentração: Fisiologia Vegetal). 67p. 1999.

PEREIRA, M.E.C. Crescimento e composição mineral de frutos e de ramos *vegetativos* (*Litchi chinensis* Sonn.) "Brewyer" durante um ano. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia. Viçosa-MG, 87p. 1999.

SILVEIRA, J.M.F.J., BORGES, I.C.; BUAINAN, A.M. Biotecnologia e agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. Texto disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010288392005000200009&lng=pt&nrm=isso SCIELO, acesso em: 12/10/2103.

TORRES A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Eds). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. v.1. Brasília, Embrapa, 509p. 1998.

Boletim, IAC, 200, 1998. Centro de frutas – Lichia. Texto disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/frutas/frutiferas_cont.php?nome=Lichia