

## Meios nutritivos alternativos para propagação *in vitro* de plantas

Ricardo CABRAL<sup>1</sup>; Poliane LOPES<sup>1</sup>; Everton MORAIS<sup>2</sup>; Mayler MARTINS<sup>3</sup>; Ricardo CORRÊA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Estudante de Engenharia de Produção e bolsista PIBIC. <sup>2</sup> Estudante de Agronomia e bolsista PIBIC. Instituto Federal Minas Gerais (IFMG) *campus* Bambuí. Rod. Bambuí/Medeiros km 5. CEP: 38900-000. Bambuí-MG. <sup>3</sup> Professor Orientador – IFMG.

### RESUMO

O presente trabalho foi realizado no laboratório de biotecnologia (LABIOTEC) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - Campus Bambuí, com o objetivo de desenvolver um substrato para o cultivo *in vitro* de vegetais baseado em Álcool Poli Vinílico (PVA). O substrato será testado a fim de verificar o crescimento de explantes em comparação aos resultados obtidos com os substratos já existentes, como o ágar. Foram realizados experimentos para que o substrato atingisse a textura ideal. O substrato deve ter rigidez suficiente para sustentar a planta, mas sem prejudicar a difusão de nutrientes, o que prejudicaria a absorção pela planta. A única característica analisada foi se as amostras teriam a consistência próxima ao ágar sendo este o padrão. O que se mostrou uma grande dificuldade, pois os nutrientes utilizados no substrato a base de ágar, o meio MS, reagia com o ácido bórico que era o reticulador no começo do projeto e isso impossibilitou que o material se enrijecesse desta maneira impossibilitando que fossem testadas as outras etapas previamente estabelecidas no início do projeto. Com este problema passamos a trabalhar com novas hipóteses, utilizando novos reticuladores e combinando o PVA com amido e depois utilizando o PVA como substituto parcial do ágar assim diminuindo a concentração deste.

Palavras-chave: PVA, substrato, ágar.

## INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* de plantas, chamada também micropropagação, é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro (por isso, o termo *in vitro*), sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. É uma parte importante da biotecnologia, conjuntamente com outras duas áreas: DNA recombinante e fermentação. A cultura *in vitro* apresenta diferentes modalidades, conforme os objetivos de sua aplicação, como por exemplo, cultura de protoplastos, anteras, calos, células em suspensão, sementes, etc. (CID, 2001).

O meio sólido mais utilizado atualmente no cultivo *in vitro* de plantas é baseado em ágar tendo um excelente desempenho. O ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas, que pode ser dissolvido em água, formando um gel, este tem o custo muito elevado. Este alto custo torna importante à busca por um novo material capaz de substituí-lo e que tenha também bom desempenho.

O PVA é um polímero hidrogel transparente, quando intumescido, permite a observação da raiz e a identificação de contaminações. Outra característica relevante deste material é ser biocompatível e biodegradável além de apresentar alta estabilidade química, tendo alta resistência à hidrólise enzimática. Por ser a resina sintética mais produzida no mundo, é um material de baixo custo. Estas características fazem do PVA um material aparentemente promissor para a micropropagação.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver hidrogeis baseados em Álcool Poli Vinílico e avaliar seu potencial como substrato no cultivo *in vitro* vegetal.

Após a preparação do material, pretendemos avaliar seu desempenho como substrato para micropropagação de vegetais. As matrizes doadoras de explantes são plantas adultas de Orégano (*Origanum vulgare*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) que estão estabelecidas no setor de Plantas Medicinais do campus Bambuí e foram conduzidas no setor com os devidos tratamentos culturais como poda, adubações e controle fitossanitário, quando necessário.

## MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi desenvolvido utilizando-se o laboratório de biotecnologia (LABIOTEC) do IFMG campus Bambuí. Foi avaliada a influência da técnica de preparação do hidrogel e densidade de reticulação nas propriedades mecânicas do material. Com a variação desses parâmetros seria possível controlar a rigidez do hidrogel, afetando a capacidade da planta lançar suas raízes, a capacidade do hidrogel sustentar a planta e a eficiência da difusão de nutrientes no material. Neste trabalho foram analisados três diferentes substratos. Foi feita uma preparação previa de uma solução na proporção de 10 gramas de PVA em 200 ml de água, a partir da qual foram preparadas as amostras.

- 1) Meio MS em PVA, reticulados com ácido bórico e com tetraborato de sódio.

## VI Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - *campus* Bambuí

### VI Jornada Científica

21 a 26 de outubro de 2013

Foram preparadas x amostras compostas de 10 ml de solução de PVA e 10 ml de meio MS. Os compostos foram aquecidos a 90°C e mantido sob agitação por 10 minutos. Nas amostras 1, 2, 3, 4 e 5 foram adicionados respectivamente 35, 72, 104, 139 e 180 mg de ácido bórico. Observou-se que para adicionar-se o ácido bórico era necessário dissolvê-lo na solução MS, já que quando adicionado diretamente no hidrogel à solução ficava bifásica (uma fase sólida e uma líquida).

Nas amostras 6, 7 e 8, foi adicionado tetraborato de sódio como reticulador, nesses testes usamos 4 mg deste reticulador variando a ordem de adição dos componentes. Foram realizadas amostras na seguinte ordem de adição:

Amostra 6: PVA, meio MS, agente reticulador.

Amostra 7: PVA, agente reticulador, meio MS.

Amostra 8: Meio MS, agente reticulador, PVA.

A mistura foi feita sob constante agitação, a 90°C.

2) mistura de PVA e amido reticulados com ácido bórico, com a presença de meio MS.

As amostras de PVA em conjunto com amido foram feitas da seguinte maneira em 10 ml de água:

Amostra 9: 900mg de PVA + 100mg de Amido + 100mg de ácido bórico

Amostra 10: 700mg de PVA + 100mg de Amido + 300mg de ácido bórico

A mistura foi feita sob agitação, e leve aquecimento, tomando-se o cuidado de não cozinhar o amido para que não houvesse alteração de propriedades.

3) mistura de PVA e Ágar, com a presença de meio MS.

Depois dos testes com amido, passamos a trabalhar utilizando o PVA como substituto parcial do ágar. Foram feitas as seguintes amostras em 50 ml de água para avaliar esta possibilidade:

Amostra 11: 0,7g de PVA e 0,3g de ágar.

Amostra 12: 0,8g de PVA e 0,2g de ágar.

Amostra 13: 0,9g de PVA e 0,1g de ágar.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

As amostras baseadas em PVA e agente reticulante (amostras 1 a 8) não apresentaram boa resistência mecânica. Os testes feitos para verificar a influência do ácido bórico na consistência da solução mostraram que mesmo aumentando a sua quantidade não foi obtida uma diferença de resistência significativa entre as amostras.

Foram feitas análises em ordens diferentes dos componentes (Tetraborato de sódio, PVA e meio MS) para verificar se a ordem influenciaria na rigidez da solução. Constatou-se que a Amostra 6 obteve o melhor resultado, porém não o bastante para seguir em frente com os testes de propagação *in vitro*.

Avaliamos amostras constituídas de amido em conjunto com o PVA (amostras 9 e 10). Porém, as amostras não apresentaram a rigidez adequada, sendo visível o composto de forma bifásica.

A baixa rigidez das amostras pode ser devida ao agente reticulador ter reagido com os nutrientes do meio MS, impedindo assim a interação deste com o PVA.

## VI Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - *campus* Bambuí

### VI Jornada Científica

21 a 26 de outubro de 2013

Avaliamos a hipótese de o PVA ser utilizado como substituto parcial do Agar, diminuindo a proporção deste. A amostra número 11 apresentou o melhor resultado, como já era esperado por estar na mesma proporção de ágar que o substrato a base de ágar usado normalmente, mostrando-se muito consistente. Nesta amostra, a adição de PVA não teve contribuição relevante para o aumento de seu volume. A amostra número 12 se mostrou menos consistente do que a anterior, mas sua resistência mecânica permite que ela seja utilizada nos ensaios de micropropagação.

#### Quadro Resumo (parâmetros comparados com ágar)

Amostra	Consistência	Resistência mecânica
1	Líquida	Baixa
2	Líquida	Baixa
3	Líquida	Baixa
4	Líquida	Baixa
5	Líquida	Baixa
6	Líquida	Baixa
7	Líquida	Baixa
8	Líquida	Baixa
9	Formação de composto bifásico	Baixa
10	Formação de composto bifásico	Baixa
11	Gelatinoso tendendo a sólido	Média tendendo a baixa
12	Gelatinoso tendendo a líquido	Baixa tendendo a média
13	Líquido tendendo a gelatinoso	Baixa

#### CONCLUSÃO

O objetivo do trabalho é fazer com que os hidrogéis de PVA se tornem mais rígidos para garantir a sustentação do explante, porém com os resultados obtidos não foi possível determinar uma solução que se adequasse perfeitamente aos quesitos necessários para a propagação *in vitro* das plantas devido à dificuldade da reação dos reticuladores com o meio MS que impede a reticulação das cadeias de PVA. E sem que essa etapa pudesse ser cumprida se tornou impossível serem feitos os outros testes, que seriam a verificação do crescimento, não crescimento ou morte do explante no hidrogel, para após observar se os nutrientes estariam sendo adequados para a planta, somente se obteve um resultado mediano quando se utilizou a mistura de ágar com o uso de PVA, sendo necessário o teste deste no estabelecimento vegetal no cultivo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CID, Pedro Barrueto. Cultura de tecidos vegetais - uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. Ano 3, N 19, 2001.
2. TORRES, Antônio Carlos; CALDAS, Linda Styer; BUSO, José Amauri. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª Ed, V. 1. Embrapa e Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. 2001.
3. BERTOZZO, Fernanda; MACHADO, Isaac Stringueta. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. *Ciência e agrotecnologia*. V. 34, N.6, 2010.
4. LIMA, Renata Vianna; LOPES, José Carlos; SCHMILDT, Edilson Romais; MAIA, Aline Rodrigues. Germination *in vitro* of annatto seeds. *Revista Brasileira de Sementes*. V.29, N.1, 2007.
5. RAMLOV, Fernanda; PLASTINO, Estela M.; YOKOYA, Nair S. Efeitos do ágar no crescimento de explantes e na formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie (*Gracilariales*, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica*. V.32, N.3, 2009.
6. ARANHA, Isabele B.; LUCAS, Elizabete F. Poli (Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 11, nº 4, 2001.
7. LIN, H.; Liu, W.; LIU, Y.; CHENG, C. Complexation Equilibrium Constants of Poly(vinyl alcohol)-Borax Dilute Aqueous Solutions – Consideration of Electrostatic Charge Repulsion and Free Ions Charge Shielding Effect. *Journal of Polymer Research*. 9: 233–238, 2002.
8. GOMES, Eliane Carneiro; NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos Botânicos e Ecológicos. *Visão Acadêmica*. V. 4, N. 2, 2003.