



RELATÓRIO DE ESTÁGIO SOBRE CULTURA DE TECIDO
EM DENDÊ (*Elaeis guineensis* J.)

Wye College, Universidade de Londres, Inglaterra
Período 01.05 - 31.08.84

Luis Pedro Barrueto Cid
Pesquisador do CNPSD

Manaus - AM
Brasil

111

ÍNDICE

1. Introdução
 - 1.1. Algumas palavras sobre Wye College
 - 1.2. Importância do Estágio
2. Instituições Visitadas
3. Pessoas Contactadas
 - 3.1. Departamento de Horticultura de Wye College
 - 3.2. UNIFIELD T.C.
 - 3.3. TWIFORD PLANT LABORATORIES
4. Aspectos Gerais sobre o Laboratório de Cultura de Tecido do Departamento de Horticultura
5. Atividades Específicas Desenvolvidas durante o Estágio
 - 5.1. Esterelização de Raízes: Introdução
 - 5.1.1. Material e Métodos
 - 5.1.2. Testes de Viabilidade
 - 5.1.3. Meio Nutritivo Básico
 - 5.1.4. Resultados e Discussão
 - 5.1.5. Conclusões
 - 5.1.6. Referências
 - 5.2. Cultura de Embriões
 - 5.2.1. Introdução
 - 5.2.2. Material e Métodos
 - 5.2.3. Repicagem
 - 5.2.4. Resultados e Discussão
 - 5.2.5. Conclusões
6. Balanço sobre Principais Contribuições do Estágio

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pela oportunidade oferecida.

Ao Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas - IICA, pelo suporte financeiro.

À Chefia do Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê - CNPSD, Drs. Imar Cesar de Araújo, Chefe do CNPSD; Olinto Gomes do Rocha Neto, Chefe Adjunto Técnico; Tomaz de Aquino Guimarães, Chefe Adjunto Administrativo, pelo seu constante estímulo e empenho na realização desta viagem.

Aos Drs. Celso Valois e José Carlos Nascimento pelo seu empenho demonstrado para a realização desta viagem.

Ao Professor W. W. Schwabe, Diretor do Departamento de Horticultura de Wye College da Universidade de Londres, pelo convite feito e facilidades outorgadas.

A todo o corpo de pesquisadores do laboratório de Cultura de tecido do Departamento de Horticultura, em especial a Dra. Avril Blackpool pela sua orientação durante o período de estágio.

1. Introdução

1.1. Algumas palavras sobre Wye College

As informações contidas no presente relatório estão relacionados com o estágio de quatro meses (05/84 - 08/84) feito pelo autor do mesmo, no laboratório de cultura de tecido do departamento de horticultura de Wye College dependente da Universidade de Londres. Wye College está localizado no condado de Kent, no vilarejo de Wye, entre as cidades de Ashford e Canterbury no sul da Inglaterra.

A tradição pedagógica deste Centro, remonta-se ao século XIV (D.C.). Mas foi a partir de 1900 que ficou vinculado a Universidade de Londres e desde então, sua grande vocação pelos estudos das ciências agrônomicas começa a acentuar-se cada vez mais até nossos dias, em contraposição, à orientação humanística (estudo da filosofia, letras, etc.) que lhe havia sido imprimida desde suas origens medievais.

Na atualidade com mais de quinhentos estudantes de graduação e pós-graduação, Wye College oferece aos estudantes uma excelente infraestrutura de pesquisa e ensino nas mais diversas áreas da agronomia.

1.2. Importância do Estágio

No Brasil, a expansão da dendecultura, visando convertê-la numa opção agrícola no mais curto período de tempo possível, regiões em que as condições ecológicas são adequadas: algumas áreas da região Amazônica e sul da Bahia, impõe desafios técnicos muito sérios a serem resolvidos pela pesquisa. A falta de bons campos de germoplasmas consolidados, a baixa produtividade média das plantações e o pouco conhecimento dos aspectos fitossanitários e nutricionais, são alguns destes desafios cujas soluções deverão acompanhar o avanço da cultura. Por outro lado, dentro do contexto de uma programação firmemente traçada e coordenada, a capacitação de recursos humanos constitui uma exigência que não pode deixar de ser atendida, na perspectiva do aumento da produtividade da cultura. Em consonância a esta exigência, deve entender-se o estágio em Wye College, visando o aperfeiçoamento em cultura de tecido, pois, a multiplicação vegetativa do dendeziro é, também uma das ações prioritárias do Programa Nacional da Cultura tanto pelo seu impacto nos programas de melhoramento genético, quanto pela sua contribuição para aumentar a produtividade e uniformidade das plantações comerciais.



2. Instituições Visitadas

Por intermedio da Dra. Jennet Blake, tive oportunidade de visitar dois laboratórios particulares que trabalhavam em escala comercial na área de cultura de tecido, foram eles: TWYFORD PLANT LABORATORIES (TPL) e UNIFIELD T.C. LTDA.

O primeiro sediado em Boltonsborough no Sul do Oeste da Inglaterra. O segundo , sediado em Bedford, a poucos quilometros de Londres. Trata-se de modernas equipes e instalações com amplas unidades de produção e pesquisa. As unidades de produção de ambas empresas, tem capacidade para produzir milhares de plantas por ano. A UNIFIELD, por exemplo, exportou mudas clonais de dendê suficiente para instalação de campos de provas em Zaire, Cameron, Papua, Nova Guiné, Colômbia, e Indonésia . Quanto a TPL, esta trabalha com grande número de espécies de clima temperado e tropical, incluindo espécies hortigranjeiras, ornamentais e florais na sua maioria , vendidas no mercado europeu.

Em relação às unidades de pesquisa, estas constituem a retaguarda das unidades de produção e, no caso particular da TPL, entre as muitas linhas de pesquisa, estão: propagação clonal, cultura de haplóides, fusão de protoplastos, indução de mutações, limpeza clonal, armazenamento de germoplasma, etc.

De outro lado, a unidade de pesquisa da UNIFIELD tenta contornar as dificuldades inerentes à propagação vegetativa de coco e procura o aprimoramento das técnicas relacionadas com a avaliação da estabilidade genotípica do dendê, através da eletroforese, imunofluorescência e determinação de níveis de DNA nas células das plantas tidas como material clonal.

3. Pessoas Contactadas

3.1. Departamento de Horticultura de Wye College

Dr. W. W. Schwabe	- Diretor do Departamento
Dr. J. Blake	- Laboratório de Cultura de Tecido
Dr. A. Blackpool	- Laboratório de Cultura de Tecido
Dr. S. H. Mantell	- Laboratório de Cultura de Tecido
Dr. R. L. Branton	- Laboratório de Cultura de Tecido
Dr. P. Maxwell	- Laboratório de Cultura de Tecido

3.2. UNIFIELD T.C.

- | | |
|---------------|------------------------------------|
| C. J. Eeuwens | - Laboratório de Cultura de Tecido |
| L. H. Jones | - Laboratório de Cultura de Tecido |

3.3. TWYFORD PLANT LABORATORIES

- | | |
|-----------------|---------------------|
| Mr. J. Richards | - Relações Públicas |
|-----------------|---------------------|

4. Aspectos Gerais sobre o Laboratório de Cultura de Tecido do Departamento de Horticultura

Trata-se de um laboratório muito bem provido de reagentes, aparelhos, instrumentos e várias salas. As salas existentes são:

- para preparação de meios, provida de dois autoclaves automáticos e um sistema para água desionizada.
- para manutenção do material inoculado com temperatura regulada a 29°C e sem luz.
- para a manutenção do material inoculado com luz controlada a temperatura regulada a 29°C.
- para manutenção do material inoculados com luz controlada e temperatura regulada a 18°C.
- para manutenção de incubadoras (5)
- para estocagem de reagentes e soluções a uma temperatura aproximada de 5°C.
- para tirar fotografias.

No laboratório trabalham cinco Ph.D. liderados pela Dra. Jennet Blake, os quais orientam aos estudantes estrangeiros e nacionais na realização de estágios nos graus acadêmicos: MSc. e Ph.D.

Diferentes linhas de pesquisas estão sendo desenvolvidas, algumas com plantas anuais: batata, morango, crisântemos, etc, e outras com plantas tropicais perene tais como: coco, dendê e cacau. Em geral, estas linhas de pesquisas relacionam-se com: indução e seleção de mutantes, cultura de protoplastos e propagação clonal.

Com respeito a este último item, cabe mencionar os intensos esforços realizados visando dominar a técnica de embriogeneses (coco, dendê) e o microenraizamento de estacas, (cacau), em condições in vitro. Em relação a coco, tem se usa

10/11/83

do intensivamente explantes de inflorescência imaturas. Uma alta proporção de calos primários tem sido alcançado, mas os resultados em relação ao embriogeneses somáticas tem sido muito limitados. Um detalhe importante a ressaltar e a grande tendência dos calos a apresentarem pardeamento, por isso, o carvão ativado, tornou-se imprescindível nos meios utilizados. Maiores informações a respeito, poderão ser encontradas em: BRANTON & BLAKE 1983.

Os trabalhos com dendê, até agora, tem sido desenvolvidos com embriões de sementes, inflorescências imaturas e folhas jovens de seedlings.

A embriogeneses somática a partir de embriões sexuais tem sido alcançada com muito mais sucesso que, a partir dos outros explantes, embora, com os outros explantes hajam obtidos plantas também.

Entretanto, existe o convencimento de que o fenótipo do material, é muito mais decisivo que os tipos de tratamentos.

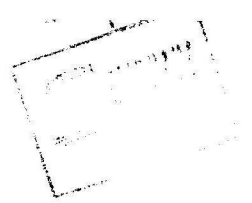
Quanto ao microenraizamento de pequenas estacas de cacau, o sucesso tem sido bastante limitado. Mas, o ponto de estrangulamento do processo, não tem estado a nível de brotação da gema, a qual brota bem, senão que, no enraizante propriamente tal, o qual é muito vagaroso e limitado. Talvez em decorrência deste problema, as pequenas folhas do broto dentro do tubo de ensaio, começam a entrar em senecencia (amarelecem) e destacam-se do rebento, depois de algum tempo.

Neste ambiente acadêmico riquíssimo e variado, desenvolveu-se meu estágio. Cabe mencionar que tanto para os estagiários como para os postulantes a M.Sc. e Ph.D. o regime de trabalho não contempla aulas ou provas, porém, apenas pesquisas. Dentro desse sistema "laissez faire", o progresso do aluno dependerá de sua auto motivação e grau de compenetração para identificar os problemas em forma sequenciada e lógica, objetivando encontrar as soluções à problemática previamente fixada, entre seu orientador e ele. Por tanto, são as horas de biblioteca e estudo, além das entrevistas periódicas com seu orientador, os fatores que guiarão a execução dos trabalhos e aprendizado do aluno.

5. Atividades Específicas Desenvolvidas durante o Estágio

5.1. Esterelização de raízes: Introdução

Considerando o número limitado de plantas de dendê no departamento de horticultura de Wye College, e, o tempo necessário para a observação e avaliação dos



resultados alcançados, foi decidido realizar basicamente ensaios sobre desinfecção de raízes pertencentes a "seedlings" de dendezeiro visto que, as informações sobre esta problemática, na literatura do dendezeiro, também não tem sido abordada.

5.1.1. Material e Métodos

Os seedlings de dendezeiro, (*Elaeis guineensis* J.), do qual as raízes foram extraídas, tinham aproximadamente dois anos de idade, altura variáveis, e eram mantidos em cada de vegetação com luz natural e temperatura de 28 ± 5 C. Os vasos que continham estas plantas, eram de plásticos com solo não esterelizado, mas, sendo este periodicamente adubado, com uma mistura comercial de N P K Mg.

As raízes extraídas mediante uma tesoura, sob jato de água de torneira. A seguir colocadas num pequeno saco plástico e lavadas ao laboratório, onde, depois de ser lavadas com água de torneira, eram separadas em grupos de acordo com sua cor. Os seguintes grupos de raízes foram estabelecidos: primárias brancas, secundárias brancas, primárias e secundárias marrons.

Uma vez separados os diferentes grupos de raízes, estas foram submetidas aos diferentes ensaios programados no processo de assepsia. Estes ensaios, incluíam diferentes agentes, concentrações e tempos de exposição, tabela 1. Depois da exposição ao cloreto de mercúrio, $HgCl_2$, permanganato de potássio, $KMnO_4$, hipoclorito de sódio, $NaClO$, e, carvão ativado, as raízes eram rigorosamente lavadas com água, (esterelizada e desionizada), mediante auxílio de um oscilador mecânico. Uma vez concluído o processo geral de assepsia, amostras de raízes, foram submetidas ao teste de viabilidade, enquanto que os restantes delas, foram inoculadas no meio nutritivo básico.

TABELA 1 - Substância, concentrações e tempo que foram utilizados nos testes de de
sinfecção.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO	TEMPO
Cloreto de mercúrio	0,1%	1,0; 2,5 e 5.0 min.
Permanganato de Potássio	0,1%	2,5; 5,0 e 10.0 min.
*Benlate	0,1%; 0,05%	15,0; 24,0 e 48.0h.
*Captan	0,1%; 0,05%	15,0; 24,0 e 48.0h.
Hipoclorito de Sódio	5,0%; 10,0%	10,0 e 20,0 min.
Carvão Ativado	2,5%; 5,0%	24,0, 1,0 e 0.5h.
**Bacitracin	0,025%; 0,1%	5,0 min. e incluído no meio.
***Rifampin	0,01%; 0,005%	incluído no meio
***Mycostatin	0,01%; 0,005%	incluído no meio.

* Autoclavado

** Dissolvido em água e logo ultrafiltrado.

*** Dissolvido num pouco de álcool, depois em água quente, e logo, ultrafiltrados.

Meios Sólidos

Nestes meios, foram usados explantes ao redor de 2cm de comprimento. Mas, independente da cor das raízes utilizadas foi constatado que a contaminação bacteriana começava na área subjacente das mesmas, sugerindo com isso, que a contaminação foi mais um fenômeno externo que interno, entretanto, nas raízes marrons ou amarelas as infestações foram mais pesadas e frequentes. Cabe assinalar que em relação a estes últimos tipos de raízes, não foi fácil distinguir entre uma e outra. Por este motivo, a denominação de cor marrons, incluirá também, a cor amarela.

As pesadas infestações observadas nas raízes marrons, é explicável devido a tendência deste tipo de raízes, mais velhas, para produzir considerável substâncias orgânicas, tais como: exudados, mucílagos, secreções, etc., (Rovira *et al* 1979) tudo o qual favoreceria na área circundante à raiz, rizosfera, um terreno propício para a proliferação bacteriana.

O tratamento apenas com fungicida, não contornou a contaminação com fungos nas raízes brancas ou marrons, apesar de ficarem várias horas imersas nessas substâncias. Foi necessário incluí-las em cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), para contornar definitivamente o problema. Com base no curto tempo que as raízes passaram no $HgCl_2$, infere-se que esta substância não se adentrou profundamente no tecido, e sua ação foi mais superficial. Por este motivo, apenas o tratamento com $HgCl_2$ não eliminou a contaminação por fungos, demonstrando com isso que as contaminações poderiam emergir tanto de dentro quanto da superfície externa mesma. Esta verificação foi importante, devido ao fato de que os fungicidas haviam sido previamente autoclavados, podendo conduzir à conclusão errada de que os princípios ativos de ambos, ou ao menos de um deles, teriam sido inativados.

O $KMnO_4$ foi eficaz contra a proliferação de fungos quando logo após foi aplicado fungicida, mas, foi considerado ser bastante inócua, em relação a bactérias, nos tempos e concentrações usados.

As evidências experimentais indicam que a remoção da contaminação bacteriana da superfície externa das raízes, especialmente as marrons foi difícil de erradicar.

Preocupados com este aspecto, foi incorporado, no processo asséptico o carvão ativado, pois conhece-se de longa data, suas propriedades absorventes. Foi postulado que o carvão poderia dificultar ou neutralizar o subsequente crescimento das bactérias no meio. Os resultados observados não foram decisivos neste ponto, de modo que, finalmente, sua incorporação obedeceu mais a razão de ordem teórica que prática.

Em geral, na cultura de tecido, tem-se recomendado utilizar o hipoclorito de sódio, (NaClO), na sua formulação comercial de uso doméstico, para a assepsia dos explantes, por este motivo foi também introduzido na sequência de passos implicados na limpeza das raízes. Na prática, não foram acumuladas evidências, como para justificar sua inclusão, entretanto, resultou eficaz para remover o carvão ativado, absorvido pela superfície das raízes. Por este caminho, ensaio e erro, foi tomando forma o procedimento de assepsia que foi adotado como rotina, nos tratamentos das raízes e cujas características foram as seguintes.

Cloreto de mercúrio	0,1%, 2,5 minutos
Benlate mais captan	0,05%, 15,0 h
Carvão ativado	2,5%, 1,0 h
Hipoclorito de sódio	10,0%, 10,0 minutos



Com este procedimento foi possível obter, nas raízes brancas, ao redor de 50% de não contaminação bacteriana, de outro lado, nas raízes marrons esta percentagem foi sempre muito baixa, perto de zero.

O teste de viabilidade feito logo após a aplicação de NaClO, mostrou que as raízes, especialmente brancas, permaneciam vivas. Como referência de viabilidade foi considerada a coloração do cilindro central, e, mais especialmente, a região do periciclo. Nas raízes marrons primárias, mas, com menor grau nas raízes secundárias, esta coloração foi mais fraca. É possível que em função de sua maior idade, (menor reserva, maior lignificação, menor atividade (metabólica) e/ou, uma maior porosidade para o HgCl₂, estes resultados sejam explicado.

Foi considerado, a região do periciclo como tecido indicativo de viabilidade, por que foi observado que depois da assepsia, a coloração dos ápices radiculares decaiu notoriamente, especialmente, nas raízes secundárias, quando comparadas a sua coloração com as apresentadas pelas raízes controles.

Em dendê, são encontradas raízes com diferentes idades, diâmetro, lignificação, cor, etc., por tanto, estas raízes podem refletir diferentes grau de resistências a um definido procedimento de assepsia.

De outro lado, o teste do brometo de tetrazolio (TTB) não forneceu resultados seguros e uniformes, senão até que foi usado sob condições estandarizadas de temperatura, escuridade, tempo de exposição, tipo de raízes e tecido a ser observado.

Considerando-se que as evidências indicavam que as contaminações bacterianas foram basicamente um fenômeno de localização externa, foi pensando que um tratamento com antibióticos poderia ter um efeito positivo sobre a assepsia do material. Por este motivo, as raízes, antes da inoculação, foram imediatamente imersas numa solução aquosa de Bacitracin 0,1%, durante cinco minutos. Uma semana depois de ser incubadas a 29°C, os resultados, mostraram a mesma tendência que nas brancas; concomitantemente a esta verificação, foi observado também, um declínio da viabilidade nas raízes não contaminadas. Esta perda da intensidade da cor, foi sempre constante nas marrons, por possuir as raízes marrons mais aerênquima interior que as raízes brancas, é possível que a assepsia tenha atingido as primeiras, mais negativamente que as segundas.

Em relação aos resultados das raízes brancas, estes foram mais variáveis, no caso das primárias brancas, este declínio não foi tão marcante como nas secundárias da mesma cor. Por este comportamento das raízes brancas, foi considerado que ademais do provável fator de toxicidade, também, haveria que considerar outros fatores relacionados com a viabilidade, estes outros fatores poderiam ser o nível de sacarose e de auxina no meio, (Oda Research Schemes, sem data).

Uso de Meios Líquidos

Utilizando o sistema de pontes de papéis, no interior dos tubos de ensaios, como suporte dos explantes, a hipótese da sacarose e da auxina foi testada. Foram usadas apenas raízes brancas, primárias e secundárias, de dois centímetros de comprimento. A concentração da sacarose foi de 60.0 g/l, como auxina foi usado o ácido α naftaleneacético (ANA) em duas concentrações $2,7 \times 10^{-8}M$ e $2,7 \times 10^{-7}M$.

Em alguns tratamentos foi incluído o Bacitracin, 0,025%. Os frascos inoculados foram mantidos a 29°C. As avaliações foram feitas visualmente e a intervalos semanais até os 21 dias. Os resultados mostraram não haver diferenças marcantes entre os tratamentos com e sem antibióticos, em ambos casos a contaminação alcançou perto de 60%. De outro lado, não foram encontradas diferenças na viabilidade entre tratamentos com e sem ANA. Entretanto, as raízes primárias brancas, mostram maior viabilidade que as secundárias. Foi verificado também, presença de pardeamento na região do corte das raízes, sendo que em alguns casos o pardeamento não apenas estava na superfície externa das raízes, mais também, no cilindro central das mesmas.

Por considerar que alta temperatura usada, 29 C, e a alta concentração de sacarose, 60,0 g/l, poderia ter contribuído para a oxidação fenólica, um outro ensaio foi preparado, mas, agora usando carvão ativado, 1,0 g/l, sacarose 40,0 g/l, ANA $1,1 \times 10^{-5}$ M, Bacitracin na mesma concentração e explantes de raízes brancas com cinco cm de comprimento. A temperatura usada foi de 18°C. Como controles foram usados os mesmos tratamentos a 29°C. Em ambos os casos foram colocados frascos sem carvão ativado como ponto de referências para valer melhor o efeito da oxidação fenólica. Depois de três dias, os explantes mantidos a 29°C, mostraram sem exceção, um incipiente cor opaca, mas, os mantidos a 18°C, não. Aos sete dias os primeiros estavam visivelmente contaminados, mas, os pertencentes ao outro grupo, 18 C, tinham a cor do meio líquido inalterada em alguns casos, em outros, algo opaco. O problema do pardeamento ou oxidação fenólica não foi observado, nem mesmo nos controles, sugerindo com isso, que um cuidado para não danificar as raízes tem uma importância muito mais decisiva que a presença do carvão no meio.

Foi verificado que 40% dos frascos mantidos a 18°C mostraram uma cor opaca incipiente e as raízes não contaminadas deram reação positiva com o TTB.

Para verificar se aquela coloração opaca foi causada por bactérias os frascos foram transferidos para temperatura de 29°C em outra sala.

Nos três dias seguintes, foi visto que oitenta por cento dos frascos, tinham contaminações, levantando dúvidas acerca da real eficácia do Bacitracin e impedindo uma correta interpretação acerca da real ação do ANA.

Com base neste último ensaio, foi pensado que a combinação de 29^o C e alta concentração de açúcar não é recomendável para alcançar uma boa limpeza neste tipo de material. Por este motivo, o próximo ensaio foi feito em três etapas.

Na primeira fase, foram usados: ANA, $1,1 \times 10^{-5}$ M; carvão ativado 0,1%; Rifampin + Mycostatin 0,01%; mas, não foi incluído açúcar. Foram usadas novamente raízes brancas (primárias e secundárias, 5 cm de comprimento) colocando-se quatro raízes por frasco. Os frascos foram mantidos a 18^o C.

Depois de uma semana, o aspecto transparente dos meios não foi alterado, e, o teste do TTB demonstrou na maioria das raízes reação positiva inclusive, naquelas dos frascos sem carvão ativado, usados como controle.

Na segunda fase, as raízes foram mantidas sob as mesmas condições, exceto que, nesta oportunidade foi incluída a sacarose 2,0%. Após uma semana foi verificado que 60% dos frascos não mostravam qualquer aparente contaminação. Entretanto, a presença de açúcar estimulou o desenvolvimento bacteriano, (40% dos frascos), mas este, provavelmente não foi maior devido a temperatura usada e a combinação de antibióticos.

Na terceira fase, quinze dias, as raízes não contaminadas, foram transferidas para outro meio, o qual continha as mesmas características anteriores, mas, com a sacarose a 4,0% e ANA, $2,7 \times 10^{-7}$ M. Não foi adicionado carvão ativado e a temperatura foi de 25^o C. Foi inoculada uma raiz por frasco, resultando um total de vinte frascos, os quais foram separados em dois grupos: com e sem a combinação de antibióticos já mencionados, mas, agora a uma concentração de 0,005%. Por ter as raízes primárias melhor aspecto que as secundárias, aquelas foram preferidas a estas em maior número.

Depois de uma semana, vinte e um dias, foi observado que oitenta por cento dos frascos sem antibióticos estavam contaminados, a cor do líquido dentro dos frascos era opaca. No outro grupo, havia apenas uns vinte por cento. O teste do TTB, mostrou, nas raízes não infestadas, alta viabilidade. Estes resultados confirmam a hipótese inicial no sentido que as raízes primárias brancas, tinham mais capacidade para suportar o trauma da assepsia.

Desde o ponto de vista dos objetivos do trabalho, o conjunto de ensaios realizados foram orientados basicamente a encontrar efetivo método para desinfetar e manter a viabilidade das raízes e não para testar meios para a indução de calos.

5.1.5. Conclusões

As informações apresentadas aqui permitem tirar as seguintes conclusões:

1. As raízes marrons tem uma maior carga de contaminação que as raízes brancas.
2. A contaminação bacteriana é mais difícil de vencer que a contaminação por fungos.
3. A mistura Benlate e Captan, contribuíram efetivamente para o controle de fungos das raízes.
4. As raízes primárias brancas foram as que resistiram melhor o trauma da assepsia, apresentando uma viabilidade mais duradoura.
5. O teste TTB é um bom procedimento para detectar viabilidade das raízes, desde que seja usado sob condições estandarizadas.
6. Nas raízes vivas, os tecidos com maior afinidade pelo teste TTB foram o ápice radicular e o periciclo.
7. A mistura Rifampin-Mycostatin, foi mais efetiva que o Bacitracim no controle bacteriano.
8. O prétratamento de 18°C e MS sem açúcar, resultou um bom artifício para mitigar o crescimento bacteriano.
9. Quando usados explantes de 5 cm de comprimento, não foi verificado por deamento, independente da presença de carvão ativado.

5.1.6. Referências

- BRANTON, R.L. & BLAKE, J. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. Annals of Botany 52, 673-678, 1983.
- DAWSON, R.M.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT, W.H. & JONES, K.M., eds. pH, buffers, and physiological media. In: _____. Data for biochemical research. Oxford, Clarendon Press, 1969. p. 488-90.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-97.

ODA RESEARCH SCHEMES. Research on the vegetative propagation of coconut by tissue culture. Report on ten years research under ODA Research Schemes at East Malling Research Station and Wye College (University of London) 32 p.

ROVIRA, A.D.; FOSTER, R. & MARTIN, J.K. Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: HARLY, J.L. & RUSSELL, R.S., eds. The soil-root interface. London, Academic Press, 1979. p. 1-5.

TOWILL, L.E. & MANZUR, P. Studies on the reduction of 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can.J.Bot., 53: 1097.102, 1975.

5.2. Cultura de Embriões

5.2.1. Introdução

Como uma atividade paralela e subsidiária, foram inoculados embriões em condições in vitro, visando por um lado, indução de calos e por outro, germinação com fins embriogenéticos.

5.2.2. Material e Métodos

Sementes de dendezeiro extraídos de frutos maduros no CNPSD - Manaus, foram previamente isolados de seus respectivos endocarpos lenhosos, logo, lavadas com água de torneira e sabão. A seguir colocadas a embeber em água esterelizada e destilada em copo becker por 24 h. Mais tarde todas as sementes foram submetidas por 20 minutos a uma solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v), contendo 0,05% (v/v) de "tween 20".

A seguir lavadas com água esterelizada e desionizada.

Os embriões foram removidos assepticamente com auxílio de pinças e bisturis dentro de uma câmara de fluxo laminar e inoculados em frascos com 10 ml de meio básico MS implementando com as seguintes substâncias (g/l): NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ (0.170); sulfato de adenina (0.040); sacarose (40,0) caseína hidrolisada (0.3); agar (6.0); carvão ativado (1,0), e, com ou sem ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) 4.5×10^{-4} M. O pH do meio foi ajustada a 5.8 com 0.1N de NaHO ou HCl, prévio a adição do agar e carvão ativado, e logo autoclavado a 1,0 kg/cm por 20 minutos.

Os frascos inoculados foram mantidos em escuridade a 29° C.

5.2.3. Repicagem

Os embriões germinados, no meio carente de 2,4D, foram transferidos para uma outra sala com fotoperíodo de 12 h luz, mas, com a mesma temperatura anterior.

Depois de sete semanas, as pequenas plantas foram transferidas para outro meio, para estimular seu enraizamento. Foi usado o meio básico MS, mas, com a adição de (g/l): sacarose (3.0), NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ (0,170) e agar (6.0). As condições de luz e temperatura não foram modificadas.

Em relação aos calos formados, estes foram repicados, após sete semanas, para um outro meio similar, mas, suplemento com 2,4D 2.5×10^{-6} M ou 2.5×10^{-4} M. Os frascos inoculados foram mantidos a 29°C e 12 h luz.

5.2.4. Resultados e Discussão

Aproximadamente 50% dos embriões inoculados germinaram depois de duas semanas. As condições de armazenamento das sementes, e, outras causas ligadas a fatores genéticos, podem explicar esta baixa viabilidade

Dos 50% restantes, alguns infestaram-se, outros, mostraram alguma expansão do tecido, mas não chegaram a produzir raízes ou parte aérea, enquanto que outros ficaram completamente indiferentes. Dos embriões que germinaram 45% (22,5% do total) revelaram uma germinação normal produzindo folhas e raízes, 35% (17,5% do total) mostraram somente desenvolvimento da parte aérea, enquanto que 20% (10% do total) formou apenas raízes. Esta última percentagem inclui parte aérea com menos de 2 cm de comprimento, em contraposição ao tamanho da folha dos outros grupos o qual foi mais do dobro.

Após 2 meses, o comprimento das raízes variou entre 1 a 5 cm, enquanto que, a parte aérea variou entre 2 a 5 cm.

Quanto a variabilidade dos resultados alcançados, tanto na germinação como no posterior crescimento dos embriões, esta também tem sido observada em maior ou menor grau no CNPSD usando a mesma temperatura e meio nutritivo. É possível que fatores genéticos, danos mecânicos, ou mesmo, influência do meio, possam estar envolvidos neste comportamento dos embriões.

Em relação à formação de calos, estes já haviam-se tornado incipientes aos 15 dias de inoculação.

Quinze semanas após a inoculação, alguns calos em 2,4D $2,4 \times 10^{-6}$ M tinham aproximadamente 1,0cm de diâmetro e cor amarelada, enquanto que outros eram menores, mas, clorofiláceos. Por outro lado, os calos mantidos em 2,4D 10^{-4} M foram sempre de menor tamanho e mais compactos em relação aos crescidos em presença de 2,4D $2,4 \times 10^{-6}$ M, infelizmente, alguns frascos do tratamento de 2,4D $2,5 \times 10^{-4}$ M infestaram-se algum tempo depois da primeira transferência. Como a infestação não estava no lugar do explante, senão que, na mesma espessura do meio, este problema foi atribuído à entrada de ar contaminado, quando os frascos foram retirados quente do autoclave, para ser agitado dentro da câmara de fluxo laminar com vista a uniformizar o carvão ativado dentro do meio, durante o resfriamento.

Pelo avançado tempo no estágio, não foi possível realizar ensaios sobre embriogêneses somática, tomando como ponto de partida raízes dos embriões sexuais ou calos destes.

5.2.5. Conclusões

Não foi difícil induzir calos de embriões sexuais em presença de uma alta concentração de 2,4D e carvão ativado.

A partir dos quinze dias, a formação de calos torna-se incipiente.

A repicagem dos calos para um meio com alta concentração de 2,4D torna-os mais compactos e de lento crescimento. Efeitos opostos foram verificados quando repicados para meios com baixa concentração de 2,4D.

Em se tratando de um meio adequado e de embriões viável a germinação dos mesmos é rápida, ao redor de 15 dias. A aparição de raízes pode ser um fenômeno paralelo ao desenvolvimento da estrutura foliar, ou pode estar muito adiado.

Fatores genéticos, dano mecânico ou más condições de armazenagem, podem estar relacionadas com a baixa germinação e a falta de enraizamento.

Em geral foi verificado, que os resultados quanto a indução de calos, e germinação dos embriões foram similares aos obtidos no CNPSD.

6. Balanço sobre principais contribuições do estágio

O período de treinamento foi importante porque, permitiu:

- Conversar e trocar idéias, com outros profissionais altamente gabaritados, na área de cultura de tecido.
- Apreciar melhor a utilidade dos novos equipamentos e procedimentos na prática do trabalho de laboratório.
- Acentuar, mais ainda, a convicção de que um laboratório insuficientemente aparelhado, limita muito a descoberta de fatos novos, embora, possa ter um brilhante pesquisador na sua direção.
- Consolidar, todavia mais o espírito profissional, no sentido que a atvidade científica não tem mágica, já que o trabalho constante e sério, é quem finalmente, conduz a fatos novos e relevantes.
- Sentir, a fluidez e o dinamismo das técnicas de cultura de tecido, e o tremendo dano que é estar a margem dos conhecimentos dessas inovações.
- Conhecer o grau de progresso dos trabalhos em dendê e coco.