



## Resumo Expandido

<b>Título da Pesquisa (Português):</b> Estabelecimento <i>in vitro</i> e embriogênese somática de Lichia		
<b>Título da Pesquisa (Inglês):</b> Establishment <i>in vitro</i> and somatic embryogenesis of Lichia		
<b>Palavras-chave:</b> Biotecnologia, Cultura de Tecidos, Propagação.		
<b>Keywords:</b> Biotecnologia, Tissue Culture, Propagation.		
<b>Campus:</b> Bambuí – Minas Gerais	<b>Tipo de Bolsa:</b> PIBIC	<b>Financiador:</b> IFMG
<b>Bolsista(s):</b> Camila Lopes de Souza		
<b>Professor Orientador:</b> Ricardo Monteiro Corrêa		
<b>Área de Conhecimento:</b> Biotecnologia		<b>Editais:</b> 005/2011

**Resumo:** A cultura de tecidos vegetais nada mais é do que o cultivo *in vitro* de qualquer parte de uma planta, seja esta uma simples célula, um tecido ou um órgão, sob condições assépticas. Esta técnica está baseada no fato de que qualquer célula vegetal contém toda a informação necessária para regenerar uma planta completa através de processos de dediferenciação. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do IFMG- Campus Bambuí. A etapa de estabelecimento do projeto foi realizada com o intuito de obter novas plantas *in vitro*, utilizando-se para tal semente da planta matriz. Os frutos de lichia foram colhidos na época de dezembro e as sementes inoculados em frascos contendo 15 ml de meio de cultura específico para germinação. O delineamento experimental para cada ensaio foi inteiramente casualizado, contendo 16 tratamentos com 4 repetições e 4 frascos por repetição. O segundo ensaio conduzido foi o de embriogênese somática, onde diferentes explantes (tecidos) que contém potencial de regeneração de embriões somáticos foram isolados e induzidos a produzirem células embriogênicas associando o explante ao tempo de exposição ao regulador de crescimento 2-4,D. Os explantes para embriogênese somática foram excisados de seedlings (plântulas jovens *in vitro*). Os tratamentos contendo sementes com os meios nutritivos MS e MS/2 e 0% de sacarose foram os mais eficientes na etapa de estabelecimento da cultura, por outro lado, os tratamentos para indução de embriogênese somática ainda não produziram resultados positivos devido à dificuldades com contaminação.

**Abstract:** The plant tissue culture is nothing else than the *in vitro* cultivation of any part of a plant, such as a simple cell, a tissue or an organ, under aseptic conditions. This technique is based on the fact that any plant cell contains all the required information to regenerate a complete plant through dedifferentiation processes. The assays were carried out at the Tissue Culture Laboratory of IFMG - Campus Bambuí. The *in vitro* establishment step was conducted in order to obtain new *in vitro* plants. For this purpose seeds from a mother plant was used. The lichia fruits were collected in December and their seeds were inoculated in flasks containing 15 ml of culture medium specific for germination. A completely randomized experimental design was used with 16 treatments, 4 repetitions per treatment and 4 flasks per repetition. The second assay conducted, aimed the induction of somatic embryogenesis. Different explants (tissues) having the potential to regenerate somatic embryos were isolated and induced to produce embryogenic cells by associating different explants to different exposure time to the growth regulator 2,4-D. The explants for somatic embryogenesis induction were excised from seedlings germinated *in vitro*. The best results for the establishment of new *in vitro* cultures were achieved when the seeds were inoculated on MS and MS/2 media without sucrose (0%). On the other hand, the treatments for somatic embryogenesis induction did not show positive progress yet, due to contamination problems.

## **INTRODUÇÃO:**

“As pesquisas em torno da lichieira 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”. (PEREIRA, 1999, p. 87)

“A lichia (*Litchi chinensis* Sonn) – (Sapindaceae) é uma frutífera originária da China, sendo considerada em todo o mundo como a “Rainha das frutas” por sua aparência e sabor delicado, semelhante ao da uva “Itália” e com aspecto similar a um morango”. (YAMANISHI, 2005)

A propagação da lichieira pode ser realizada tanto de forma sexuada quanto assexuada. Por via sexual, a propagação apresenta alguns entraves como perda rápida de viabilidade, ocorrência de segregação varietal e presença de longo período juvenil (10 anos ou mais para começar a produzir frutos). Assexualmente, ela é propagada via alporquia, enxertia ou estaquia, sendo a alporquia o método mais comum. A alporquia apresenta consideráveis obstáculos à expansão da cultura no Brasil, pois além dela ser considerada um procedimento caro, esse método de propagação possui baixo rendimento e produz pequeno número de mudas por planta matriz. Além disso, este método proporciona graves danos à planta matriz, devido à quantia de anelamentos efetuados.

Assim, alternativas de propagação assexual para lichieira podem ser úteis para sanar estes entraves e induzir aumento e precocidade de produção. A técnica de cultura de tecidos é uma ferramenta que pode contribuir para viabilizar a produção de mudas *in vitro* de plantas na tentativa de reduzir custos e produzir mudas com qualidade fitossanitária.

A cultura de tecidos é uma técnica onde o explante, que pode ser uma célula, um tecido, ou um órgão, é isolado e cultivado em condições assépticas sobre meio nutritivo artificial. A totipotência celular, que é o fundamento básico da cultura de tecidos, assegura que qualquer célula no organismo vegetal contém informações genéticas para a regeneração de uma planta completa.

A germinação *in vitro* de sementes e embriões é uma estratégia importante no processo de micropropagação, visto que as sementes em sua formação mantêm-se livres de muitos patógenos como as viroses. Vários são os fatores que afetam a germinação como água, temperatura adequada, luz (em função da espécie), reservas endógenas da semente, reguladores de crescimento e concentração osmótica do meio, de acordo com a espécie. Através do uso da técnica de cultura de tecidos vários destes fatores podem ser fornecidos e controlados visando aumentar a percentagem de germinação.

“A embriogênese somática é um método importante para propagação de plantas elite *in vitro* em larga escala. Também é uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião”. (YEUNG, 1995, p. 205-247)

No entanto, para lichia, não foram encontrados protocolos de indução e regeneração de embriões somáticos e poucos trabalhos e respostas com o processo de micropropagação. O Brasil pode ser um grande produtor desta fruta, podendo gerar excedentes para exportação, visto que o país possui clima propício para expansão desta cultura, que se adapta bem ao clima subtropical.

Portanto, a iniciativa deste 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 *in vitro* via germinação de sementes

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 foram coletados e armazenados em uma caixa de isopor onde ficaram até o processo de inoculação. As sementes foram imersas em álcool por 1 minuto e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos. Após os explantes foram levados para a sala de inoculação e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada para retirar o excesso de hipoclorito. Em seguida, foram inoculados em frascos contendo 15 ml de meio de cultura específico para germinação. (Tabela 1)

**Tabela 1: Meios de cultivo e sacarose na germinação de sementes *in vitro* de Lichia. IFMG-Bambuí. 2015.**

Tratamentos	Meio nutritivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )
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

O delineamento experimental para cada ensaio foi inteiramente casualizado com 4 repetições sendo cada parcela experimental composta por 4 tubos de ensaio e 1 semente por tubo. O ensaio foi realizado em dezembro época propícia dos frutos e após 60 dias foi feita a avaliação.

## II- Embriogênese Somática

Após as plântulas de lichia estarem estabelecidas *in vitro*, diferentes explantes (tecidos) com potencial de regeneração de embriões somáticos foram isolados de diferentes regiões da plântula e induzidos a produzirem células embriogênicas associando o explante ao tempo de exposição ao regulador de crescimento 2,4-D (Tabela 2). Os explantes para embriogênese somática foram compostos de seedlings (plântulas jovens *in vitro*). De um seedlings foram isoladas diferentes regiões como ápice caulinar e discos foliares.

A obtenção da região dos seedlings para induzir a embriogênese foi feita em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinça e bisturi. O meio de cultivo utilizado foi o MS com 3% de sacarose ajustando-se o pH para 5,8. Posteriormente o meio foi autoclavado a 121°C e 1atm de pressão. Os meios de cultivo foram vertidos em mini placas de petri e conduzidos à sala de inoculação.

**Tabela 2: Fontes de explante e tempo de permanência do explante no meio com 2,4-D (8 mg L<sup>-1</sup>) na indução de embriões somáticos de lichia. IFMG-Bambuú. 2015.**

Tratamentos	Explante	Tempo de permanência no 2,4-D (Dias)
1	Ápice caulinar	5
2	Ápice caulinar	10
3	Ápice caulinar	20
4	Ápice caulinar	30
5	Disco foliar	5
6	Disco foliar	10
7	Disco foliar	20
8	Disco foliar	30

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 6 repetições, sendo a parcela experimental constituída de 4 placas de petri e 4 explante por placa. O ensaio foi realizado em março e avaliado após 7 dias da inoculação.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Observou-se que o tratamento 1 com meio nutritivo MS com 0% de sacarose obteve maior altura de plântulas e nº de folhas; o tratamento 5 com meio nutritivo MS/2 com 0% de sacarose proporcionou também maior altura de folhas, sendo igual estatisticamente ao tratamento 1. Os demais tratamentos não influenciaram positivamente nas variáveis números de folhas e altura.

Segundo Costa A.S *et al* (2007), “no alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), as avaliações para as características contaminação, número de brotos formados e número de folhas por explante não houve diferença significativa em função dos fatores testados. A contaminação variou de 33,7 a 50,6, o número de brotos formados variou entre 1,17 e 1,65 e o número de folhas por explante, entre 1,77 e 3,07. A concentração de 0,8% de hipoclorito de sódio proporcionou um número significativamente maior ( $p < 0,01$ ) de

folhas por broto ( $y = 0,021x + 1,019$ ,  $R^2 = 0,97$ ), sugerindo que essa concentração permitiu o desenvolvimento e crescimento dos explantes e que o aumento da concentração de hipoclorito de sódio resultou no aumento do número de folhas por brotos”.

De acordo com Costa A. S. *et al* (2007), “observaram que não houve efeito significativo dos meios-de-cultura sobre as características analisadas, exceto para a porcentagem de enraizamento. O meio-de-cultura WPM proporcionou um maior enraizamento dos explantes em relação ao meio B5. Para esta característica os meios de cultura MS e WPM proporcionaram resultados estatisticamente iguais. De forma geral, os meios de cultura MS, WPM e B5 proporcionaram resultados estatisticamente iguais, porém optou-se pela utilização do meio MS para multiplicação *in vitro* de *L. sidoides* por ser o meio padrão mais empregado na cultura de tecidos. No estabelecimento *in vitro* o meio-de-cultura é um fator importante para o desenvolvimento dos explantes e varia de acordo com a espécie ou, até mesmo, entre genótipos”.

Segundo Barin L. B. *et al* (2012), “no cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg) houve efeito significativo do tipo de meio de cultura na porcentagem de germinação *in vitro*. Na ausência dos sais do meio de cultura MS houve 100% porcentagem de germinação. Não foi observado efeito do tipo do cambuizeiro na porcentagem de germinação. Para a altura das plântulas, houve efeito significativo apenas do meio de cultura. As plântulas mantidas no meio de cultura ½ MS apresentaram, em média, maior desenvolvimento em altura, não havendo diferenças entre os tipos e interação entre os fatores. Os meios 0 MS e ½ MS apresentam potencial para estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* de cambuizeiro, diminuindo os custos de produção, por demandarem menor concentração dos sais do meio MS para o desenvolvimento de plântulas”.

**Tabela 3: Número de folhas e altura de plântulas de sementes de lichia germinadas em meios nutritivos combinados com sacarose. IFMG-BambuÍ. 2015.**

Tratamentos	Meio nutritivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Nº Folhas	Altura (cm)
1	MS	0	3.08 a	7.96 a
2	MS	10	0.75 b	2.74 b
3	MS	20	0.00 b	0.00 b
4	MS	30	0.00 b	0.00 b
5	MS/2	0	1.00 b	4.25 a
6	MS/2	10	1.00 b	0.00 b
7	MS/2	20	0.00 b	0.00 b
8	MS/2	30	0.00 b	0.00 b
9	MS/4	0	0.00 b	0.00 b
10	MS/4	10	0.00 b	0.00 b
11	MS/4	20	0.00 b	0.00 b
12	MS/4	30	0.00 b	0.00 b
13	WPM	0	0.50 b	2.25 b
14	WPM	10	0.00 b	0.00 b

15	WPM	20	0.00 b	0.00 b
16	WPM	30	0.75 b	2.13 b

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, para os diferentes tipos de sementes germinadas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5%.

Na inoculação dos explantes para a etapa de embriogênese somática, foram utilizados diferentes explantes (tecidos) que contém potencial de regeneração de embriões somáticos. Após ser coletado o explante ficou na água corrente durante 24 horas, em seguida foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e levados para a sala de inoculação e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada para retirar o excesso de hipoclorito. Mesmo seguindo todas as estas recomendações para serem desinfestados 7 dias após a inoculação 100% das placas com os explantes haviam sido contaminados, o que paralisou a continuação da etapa.

A porcentagem de contaminação dos explantes foi variável em razão da fase da cultura *in vitro*, com médias de 4% durante as fases de indução de calos e de embriões somáticos, 30% durante a germinação dos embriões somáticos, 10% na multiplicação, 15% no alongamento e 5% no enraizamento das plântulas, sendo a maior parte das contaminações causada por bactérias, provavelmente de natureza endógena. A contaminação endofítica em tecidos de mamoeiro é bastante comum (Drew & Smith, 1986; Rajeevan & Pandey, 1986; Winnaar, 1988). A utilização de explantes provenientes de plântulas germinadas *in vitro* (Chen et al., 1987; Yamamoto & Tabata, 1989) não foi suficiente para contornar os níveis de contaminação; portanto, em trabalhos posteriores, devem ser adicionados antibióticos ao meio de cultura, conforme recomendam Reuveni et al. (1990).

Portanto o meio MS e MS/2 e 0% de sacarose foram os mais significativos nas avaliações da altura e quantidade de folhas no experimento de germinação de semente. Com tudo, pode-se afirmar que a concentração de hipoclorito utilizada foi insuficiente para desinfestação das sementes e do explantes para embriogênese somática, mesmo que lavadas com água destilada autoclavada 3 vezes.

## CONCLUSÕES:

O melhor meio para estabelecimento de lichia é o MS sem adição de açúcar.

Não foi possível induzir embriogênese somática devido a contaminação fúngica.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

BARIN, L. B.; LEDO, A. da S.; MUNIZ, A. V. C. da S. **Efeito de diferentes meios de cultura na germinação in vitro do cambuzeiro**. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS, 3., 2012, Aracaju. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67875/1/Cambui.pdf>> Acesso em:02/08/2015.

CHEN, M.H.; WANG, P.J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.6, p.348-351, 1987.

COSTA AS; ARRIGONI-BLANK MF; BLANK AF; MENDONÇA AB; AMANCIO VF; LEDO AS. 2007. **Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro**. Horticultura Brasileira 25: 068-072.

DREW, R.A.; SMITH, N.G. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.61, n.4, p.535-543, 1986.

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.

RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Economics of mass propagation of papaya through tissue culture. In: WITHERS, L.A.; ANDERSON, P.G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London : Butterworths, 1986. p.211-215.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R.; LAVI, U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.20, p.41-46, 1990.

WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.12, n.3, p.305-310, 1988.

YAMAMOTO, H.; TABATA, M. Correlation of papaya and enzyme production with laticifer formation in somatic embryos of papaya. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.8, p.251-254, 1989.

YAMANISHI, O. K. **Panorama da produção de lichia na china**. Texto disponível em:  
<[http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra\\_conteudo.asp?conteudo=8225](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=8225)> Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro. 2005. Acesso: 10/03/2015

YEUNG, E. C. **Structural and development patterns in somatic embryogenesis**. In: TRORP, T. A., ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 205-247. 1995.