

Estudos do controle da oxidação e da contaminação visando o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Mezilaurus navalium* (Allemão) Taub. ex Mez (Lauraceae).

De Castro, Carlos Renato Nogueira¹; Ribeiro, Ivan Gonçalves²; Callado, Cátia Henriques³; Albarello, Norma³.

¹Aluno de Graduação, ²Aluno de Mestrado, ³Professor Adjunto - Departamento de Biologia Vegetal - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rua São Francisco Xavier, 524, CEP.20.550-013, Rio de Janeiro, RJ, (21) 2587-7361, email: labplan_uerj@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Mezilaurus navalium, conhecida como “tapinhoã”, é uma espécie da família Lauraceae, endêmica da costa brasileira e seriamente ameaçada de extinção. Nas décadas passadas, sofreu intensa exploração, sobretudo pela madeira resistente que confere à espécie grande importância econômica. Além da indústria naval, foi muito utilizada em construções pesadas e móveis, substituindo o carvalho europeu (Rizzini & Mors, 1976; Werff, 1978; Corrêa, 1984).

Atualmente, poucos exemplares de *M. navalium* são encontrados e, freqüentemente, são atacados por insetos, principalmente os frutos que apresentam grande quantidade de óleo e facilmente se oxidam. Além disso, as sementes apresentam baixa viabilidade devido a dificuldades fisiológicas, o que compromete as taxas de germinação, agravando a situação dessa espécie, considerada em processo de extinção (Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 2000).

Tendo em vista as dificuldades de propagação e a restrita ocorrência de *M. navalium*, os métodos de cultura de tecidos vegetais constituem uma importante alternativa para a sua conservação. Entretanto, o estabelecimento da cultura *in vitro* de espécies arbóreas apresenta inúmeras dificuldades, dentre as quais, a intensa contaminação dos tecidos por fungos e bactérias, sobretudo quando as plantas sob condições de campo representam a única fonte de obtenção do material botânico (Grattapaglia & Machado, 1998; Sato et al., 2001). Adicionalmente, a propagação *in vitro* em espécies de Lauraceae tem apresentado dificuldades com relação ao potencial morfogênico devido ao alto índice de oxidação dos tecidos (Fior et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo definir protocolos de desinfestação e controle da oxidação de explantes de um exemplar arbóreo de *M. navalium*.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico (galhos com folhas) foi coletado na Reserva Biológica do Tinguá (Nova Iguaçu - RJ), a partir de um exemplar arbóreo (planta matriz) com aproximadamente 30 metros de altura. Folhas e caules foram utilizados como explantes iniciais e submetidos aos tratamentos de descontaminação e controle da oxidação no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Diferentes tratamentos de descontaminação foram aplicados a cada tipo de explante. As folhas foram expostas ao detergente Fisiohex II[®] e lavadas com água destilada esterilizada. A seguir, grupos de 15 explantes foliares foram submetidos a 25 tratamentos com as seguintes substâncias: hipoclorito de sódio comercial; álcool 70%; peróxido de hidrogênio; Hidroazul[®] (tricloro-S-triazina triona); Benlate 500[®] (2- benzimidazolecarbamato).

Após os tratamentos, as folhas foram lavadas e seccionadas com separação parcial do pecíolo e da lâmina foliar. Os explantes foliares (pecíolo isolado ou com a base foliar) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (Murashinge & Skoog, 1962) sem reguladores de crescimento e solidificado com agar a 0,8% (Merck).

Os caules foram seccionados em segmentos de 15 cm e lavados com detergente Fisiohex II[®], com posterior imersão em hipoclorito a 2% acrescido de Tween 80 (0,05% v/v),

durante 40 minutos. A seguir, os segmentos caulinares foram lavados com água estéril por três vezes, durante cinco minutos cada.

Após a lavagem, os segmentos caulinares foram flambados até o escurecimento da parte externa, sendo então utilizados para obtenção de fragmentos internos ao órgão (0,7-1,0cm), excluindo o tecido de revestimento. Estes fragmentos foram utilizados como explantes para iniciar as culturas em meios sólido e líquido. Antes da inoculação, os explantes foram imersos em uma solução antioxidante (Kowalski & van Staden, 2001) contendo ácido ascórbico (500mg.L^{-1}) e ácido cítrico (250mg.L^{-1}), durante 10 minutos.

Para o controle da oxidação em meio sólido, foram utilizados os meios básicos MS $\frac{1}{4}$ e WPM (Lloyd & McCown, 1980) destituído de ferro e cobre (Kowalski & van Staden, 2001). Ambos os meios foram suplementados com PVP (polivinilpirrolidona), ácido cítrico, ácido ascórbico ou L-cisteína. Os explantes foram inoculados em frascos de 4,5 cm x 4,5 cm contendo 10 mL de meio.

Na cultura líquida, foi utilizado o meio WPM destituído de ferro e cobre suplementado com 750mg.L^{-1} ou 1000mg.L^{-1} de ácido ascórbico. Os explantes foram pré-tratados em solução antioxidante (Kowalski & van Staden, 2001) contendo ácido ascórbico (500mg.L^{-1}) e ácido cítrico (250mg.L^{-1}), durante 10 minutos e inoculados em frascos do tipo erlenmeyer (125 mL) sob agitação (100 rpm). Todas as culturas foram incubadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz e avaliadas sob luz verde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descontaminação de explantes foliares não apresentou resultados satisfatórios (Tabela 1), provavelmente devido ao fato da única fonte de material botânico serem indivíduos adultos crescidos e mantidos sob condições de campo, em área florestal fechada. Espécies florestais nativas usualmente apresentam elevada concentração de microorganismos (Sato et al., 2001). Apesar da contaminação não ter sido controlada, os melhores resultados foram obtidos com o pré-tratamento utilizando Benlate por 24h, sobretudo quando a substância foi associada ao hipoclorito e álcool 70, nos maiores tempos (T21-T25). A partir desses resultados, novos experimentos deverão ser conduzidos testando a inclusão do Benlate no meio de cultura. Sato et al. (2001) encontraram efeitos antioxidante e fungicida com a suplementação de Benlate ao meio de cultura visando à micropropagação de *Celtis* sp.. Os autores verificaram que na concentração de 200mg.L^{-1} , o uso de Benlate inibiu o crescimento de fungos não causando toxidez aos tecidos.

Para os explantes caulinares, o tratamento empregado mostrou-se eficiente apresentando 80-90% dos explantes livres de contaminação, tanto na cultura em meio sólido quanto em meio líquido. A técnica utilizada da flambagem tem sido recomendada em casos de materiais resistentes ou explantes que se encontram protegidos, após a imersão na solução desinfestante (Gratapaglia & Machado, 1998).

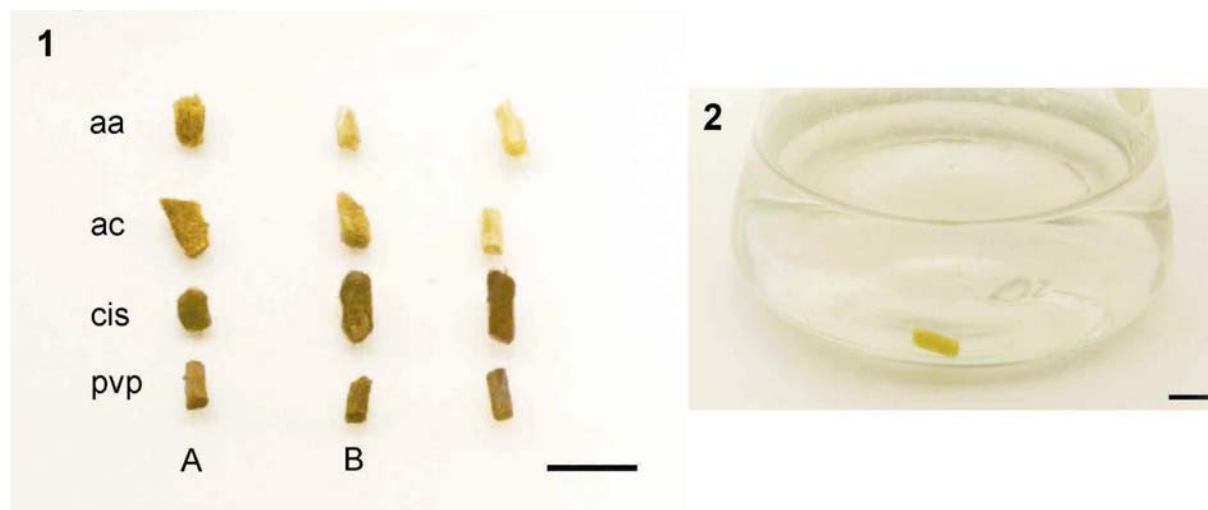
Em relação à oxidação, o melhor tratamento em meio sólido consistiu da adição de ácido cítrico ou ácido ascórbico (Figura 1) nas mais altas concentrações (Tabela 2). Porém, as culturas mantidas em meio líquido WPM sem adição de ferro e cobre apresentaram os melhores resultados, indicando a maior eficiência desse sistema pela associação de fatores com ação antioxidante, tais como a maior exposição dos tecidos à alta concentração da substância antioxidante, o reduzido contato dos explantes com o oxigênio e a ausência de ferro e cobre na composição do meio (Figura 2). O uso do meio WPM destituído de ferro e cobre mostrou resultados positivos no controle da oxidação no cultivo *in vitro* das espécies arbóreas *Ocotea bullata* e *Warburgia salutaris* (Kowalski & van Staden, 2001), principalmente com a adição de ácido cítrico. O tratamento com carvão ativado, usualmente recomendado para trabalhos desta natureza, não propiciou resultados satisfatórios para estas espécies. No estudo em pauta, a adição de carvão ativado também não foi eficaz no controle da oxidação *in vitro* de *M. navalium* (Ribeiro, I. G., comunicação pessoal), além de comprometer a visualização do material contaminado. A ausência dos metais foi outro fator positivo nos protocolos utilizados no presente trabalho, considerando a possível atuação do ferro e do cobre na liberação e oxidação de compostos fenólicos, conforme mencionado por Kowalski & van Staden (2001).

A descontaminação e o controle da oxidação são etapas imprescindíveis e limitantes na iniciação das culturas vegetais sob condições *in vitro*. Espécies lenhosas, em particular, apresentam muitas dificuldades no estabelecimento destas etapas, sobretudo quando ocorrem em regiões com alta umidade, que favorecem a multiplicação de fungos. Além disso, estas plantas apresentam altas taxas de oxidação, particularmente as espécies tropicais que possuem concentrações elevadas de compostos fenólicos. Quando as células são lesadas, essas substâncias são oxidadas, causando escurecimento e comprometimento no crescimento do tecido (George, 1993). Outro fator que contribui para dificultar o estabelecimento da cultura é a idade das plantas utilizadas como doadoras de explantes, devido ao alto nível de diferenciação de seus tecidos. Fior *et al.* (2007) reportam o maior potencial morfogênico encontrado nos tecidos juvenis de *Persea wildenovii*, uma espécie da família Lauraceae, quando comparado aos experimentos onde tecidos maduros foram testados, além destes também apresentarem altas taxas de contaminação e oxidação.

Tabela 1. Explantes foliares de *Mezilaurus navalium* submetidos a diferentes tratamentos de descontaminação.

Tratamento	Tempo de exposição (min)					Contaminação (%)		
	Hidroazul 2%	NaOCl 2%	Etanol 70%	H ₂ O ₂	Benlate	CF	CB	TC
T1	10	-	-	-	-	86,7	6,7	93,4
T2	20	-	-	-	-	86,7	0	86,7
T3	30	-	-	-	-	60	0	60,0
T4	-	15	-	-	-	100	0	100,0
T5	-	30	-	-	-	100	0	100,0
T6	-	45	-	-	-	100	0	100,0
T7	-	30	1	-	-	86,7	6,7	93,4
T8	-	30	2	-	-	73,3	6,7	80,0
T9	-	30	3	-	-	86,7	0	86,7
T10	-	30	4	-	-	93,4	0	93,4
T11	-	30	5	-	-	93,4	0	93,4
T12	-	40	10	-	-	86,7	6,7	93,4
T13	-	40	-	5	-	93,4	0	93,4
T14	-	40	-	10	-	80,0	13,3	93,3
T15	-	-	10	10	-	86,7	13,3	100
T16	-	40	10	5	-	100	0	100
T17	-	-	10	-	10	86,7	13,3	100
T18	-	-	-	10	10	80	13,3	93,3
T19	-	30	-	-	10	86,7	6,7	93,4
T20	-	30	10	10	10	93,4	0	93,4
T21	-	40	5	-	*	40	46,7	86,7
T22	-	40	10	-	*	53,3	26,7	80,0
T23	-	30	5	-	*	66,7	26,7	93,4
T24	-	30	10	-	*	33,4	33,4	66,8
T25	-	50	10	-	*	73,4	0	73,4

CF = contaminação por fungo; CB = contaminação por bactéria; TC = total de explantes contaminados; * Explante mantido por 24 h.



Explantes caulinares de *Mezilaurus navalium* submetidos a diferentes tratamentos visando o controle da oxidação: Figura 1 - Segmentos inoculados em meio MS 1/4 suplementado com ácido ascórbico (aa), ácido cítrico (ac), L-cisteína (cis) e PVP nas concentrações de 250 (A), 500 (B) e 750 (C) mg.L⁻¹. Barra: 1,1 cm. Figura 2 - Explante em meio líquido WPM sem ferro e cobre, suplementado com 1000 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico. Barra: 0,6 cm.

Tabela 2. Avaliação do grau de oxidação dos explantes caulinares de *Mezilaurus navalium* em meio sólido suplementado com diferentes substâncias (mg.L⁻¹) com efeito antioxidante.

Tratamento	Meio	PVP	Ácido Cítrico	Ácido Ascórbico	L-Cisteína	G.O.
T1	MS0	-	200	-	-	4
T2	MS 1/4	250	-	-	-	4
T3	MS 1/4	500	-	-	-	4
T4	MS 1/4	750	-	-	-	4
T5	MS 1/4	1000	-	-	-	3
T6	MS 1/4	-	-	250	-	3
T7	MS 1/4	-	-	500	-	2
T8	MS 1/4	-	-	750	-	2
T9	MS 1/4	-	250	-	-	3
T10	MS 1/4	-	500	-	-	3
T11	MS 1/4	-	750	-	-	2
T12	MS 1/4	-	-	-	250	4
T13	MS 1/4	-	-	-	500	4
T14	MS 1/4	-	-	-	750	4
T15	MS 1/4	-	500	250	-	2
T16	MS 1/4	-	250	500	-	2
T17	MS 1/4	-	500	500	-	2
T18	MS 1/4	-	250	750	-	2
T19	WPM*	-	-	100	-	2
T20	WPM*	-	-	250	-	1
T21	WPM*	-	-	500	-	1

G.O.= grau de oxidação: 1- leve; 2- moderado; 3- intenso; 4- muito intenso.

WPM* = meio básico WPM destituído de ferro e cobre.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram-se promissores no estabelecimento de um protocolo de descontaminação e controle da oxidação de explantes caulinares de um exemplar adulto de *M. navalium*. Novos experimentos estão sendo conduzidos com o objetivo de otimizar os protocolos utilizados e avaliar o potencial morfogênico deste material visando à multiplicação e conservação *in vitro* de *M. navalium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

FIOR, C. S.; Rodrigues, L. R.; Nilson, A. D.; Leonhardt, C. Aspectos da Propagação de *Persea Willdenovii* Kosterm. **Rodriguésia**, v.58, n.1, p.27-44, 2007.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2 ed. England: Exergetic Ltda. 690p, 1993.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Org). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1.ed. Brasília: SPI, v.1, p. 183-260, 1998.

KOWALSKI, B. & van STADEN, J. *In vitro* culture of two threatened South African medicinal trees - *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. **Plant Growth Regul.** v. 34, p. 223-228, 2001.

LLOYD, G., MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Comb. Proc. Intern. Plant Propag. Soc.**, v.30, p.421-427, 1981.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** n.1, p.437-496, 1962.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.D. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo. EPU, Ed. da Universidade de São Paulo. 207p. 1976.

SATO, A. Y., DIAS, H. C. T., ANDRADE, L. A., SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SECRETARIA MUNICIPAL DE MEIO AMBIENTE. **Espécies ameaçadas de extinção no município do Rio de Janeiro: Flora e Fauna**, p.65, 2000.

WERFF, H. A. Revision of *Mezilaurus* (Lauraceae). **Ann. Missouri Bot. Gard.** v.74, p.153-182, 1987.

PALAVRAS-CHAVES

Mezilaurus navalium; descontaminação; antioxidantes; lenhosas; cultura *in vitro*.