

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS

=====

RELATORIO DE ESTAGIO

=====

Aluno: JOSE ANDRES YUNES

Orientador: APARECIDO LIMA DA SILVA

R 96
ex.1

- Florianopolis -
1988

=====

APRESENTAÇÃO

=====

O presente relatório, faz jus aos trabalhos desenvolvidos durante o período de 19/12/87 a 30/01/88 sob orientação do professor Aparecido Lima da Silva, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias /Universidade Federal de Santa Catarina, tendo por finalidade, submeter ao julgamento do corpo docente do CCA, a validade das atividades desenvolvidas como estágio curricular supervisionado obrigatório.

Neste, não só serão relatadas as atividades práticas desenvolvidas, mas também, os princípios da orientação teórica envolvidos. Para tanto, utilizaram-se artigos e textos a respeito, transcrevendo várias vezes, com poucas modificações, o texto do autor, sem mesmo citá-lo nominalmente. Portanto, fica claro a inutilidade deste trabalho como revisão bibliográfica sobre o assunto, não somente pela sua metodologia de elaboração, mas pelos seus objetivos.

=====

SUMARIO

=====

* INTRODUCAO

* BIOTECNOLOGIA E CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

1. CULTURA DE CALOS
 - 1.1- Organogenese
 - 1.2- Embriogenese somatica
2. SUSPENSÕES CELULARES
3. CULTURA DE ORGÃOS
 - 3.1- Cultura de embriões somáticos
 - 3.2- Cultura de anteras
 - 3.3- Cultura de ovulos
4. CULTURA DE MERISTEMAS
5. CULTURA DE PROTOPLASTOS

* METODOLOGIAS BÁSICAS EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

1. DESINFESTACAO DO EXPLANTE
2. FONTE DE EXPLANTE
3. MEIO NUTRITIVO
 - 3.1- Sais minerais
 - 3.2- Constituintes organicos
4. CONDIÇÕES AMBIENTAIS

* ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

1. ATIVIDADES GERAIS
 - 1.1- Limpeza de material
 - 1.2- Preparo de solucoes estoque
 - 1.3- Preparo do meio de cultura
2. ATIVIDADES RELATIVAS AO CULTIVO "IN VITRO" DE *M. velutina*
 - 2.1- Introducao
 - 2.2- Atividades relativas ao estudo de meios para proli-feracao de calos visando a obtencao de principios ativos de interesse farmacologico
 - 2.2.1- Cultivo "in vitro" de calos
 - 2.2.2- Cultivo "in vitro" de sementes
 - 2.3- Micropropagacao de *M. velutina*
 - 2.3.1- Avaliacao de experimento previo de multipli-cacao de brotos "in vitro"
 - 2.3.2- Preparo de novos meios para multiplicacao e, isolamento de meristemas
 - 2.3.3- Propagacao de *M. velutina*
3. ATIVIDADES RELATIVAS AO CULTIVO "IN VITRO" DE *F. selloviana*
 - 3.1- Introducao
 - 3.2- Formulacao de meios para o cultivo de meristemas
 - 3.3- Isolamento de meristemas de *F. selloviana*
4. OUTRAS ATIVIDADES

- * CONCLUSAO
- * TEXTOS CONSULTADOS
- * AUTOAVALIACAO DE APROVEITAMENTO
- * PROGRAMACAO DIARIA DESENVOLVIDA
- * ANEXO

=====
INTRODUCAO
=====

Concretamente, um Pais alcanca plena soberania, na medida em que se apoia sobre fortes alicerces de desenvolvimento cientifico e tecnologico, capaz de criar e sustentar toda a "maquinaria" da producao de bens responsaveis pela melhoria das condicoes de vida do seu povo.

A crescente densidade populacional e o esgotamento e degradacao dos recursos naturais, compromete o suprimento das necessidades primarias das pessoas.

Quanto a alimentacao, o aumento da produtividade agricola por area, juntamente com a busca de novas fontes alternativas de alimentos, e a unica saida. Neste ponto, a biotecnologia adquire grande relevancia: melhorando a eficiencia da producao biologica sob as mais variadas condicoes, pela manipulacao genetica e pelo aperfeicoamento de novas tecnicas para melhorar a reproducao de plantas.

Por outro lado, a experiencia historica nos mostra claramente os maleficios de uma dependencia no ambito das inovacoes tecnologicas.

Neste contexto, a Universidade e Instituicoes de pesquisa devem viabilizar o desenvolvimento cientifico nesta area, formando recursos humanos cientifica e socialmente capacitados para criar e aperfeicoar tecnologias que realmente potencializem exponencialmente a producao biologica dentro do ambito economico, social e ecologico proprio, evitando que a pesquisa e a

aplicacao de seus recursos so se revertam em beneficio de alguns poucos.

A realizacao de estagios, creio, e um passo na formacao dos recursos humanos, sendo o presente relatorio um comprovante disto.

=====

. BIOTECNOLOGIA E CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

=====

Entende-se por biotecnologia, as técnicas e processos que se utilizam de organismos vivos ou partes destes, para modificar produtos, melhorar a eficiência da produção de plantas e animais ou desenvolver microorganismos de interesse científico, representando as tentativas do homem controlar o mundo biológico do qual faz parte e que o rodeia.

Empírica de início, e no mundo dos microorganismos que encontram-se os exemplos mais frizantes da biotecnologia tradicional, com a fabricação de queijos, vinho, cerveja, etc..

Com Pasteur, dá-se a passagem, no mundo da biologia, do conhecimento empírico para o conhecimento racional.

A partir deste ponto, e com o estabelecimento da química e invenção do microscópio, o homem passa a aprisionar a vida em tubos de ensaio, para melhor conhecê-la e poder controlá-la.

Descoberto o processo de fermentação alcoólica, se assentam as bases da enzimologia e nasce a bioquímica. Desde então, os processos bioquímicos adjacentes aos fenômenos fisiológicos visíveis em microorganismos, plantas e animais vem sendo elucidados.

Com a descoberta das leis de Mendel e determinação da estrutura dos ácidos nucleicos, deu-se condições para o estabelecimento dos princípios que regem a regulação do metabolismo celular, nascendo a biologia molecular.

Com as aplicações das abordagens da biologia molecular

para dominar o comportamento das células, desenvolveu-se a técnica do DNA recombinante (transferiu-se genes de insulina de células animais para células de E. coli, onde se integraram no genoma e se expressaram) e com esta, é gerada a Moderna Biotecnologia.

Esta nova biotecnologia, alicerçada nos conhecimentos adquiridos recentemente da biologia celular e molecular, abrange, atualmente, uma multiplicidade de técnicas e processos que se utilizam da célula (unidade de vida) para gerar inovação tecnológica.

De maneira geral, a biotecnologia pode ser dividida em três grandes abrangências: biotecnologia de microorganismos, biotecnologia vegetal e biotecnologia animal.

A biotecnologia vegetal reúne várias técnicas de cultura de tecidos e biologia molecular na busca de produtos de origem vegetal de melhor qualidade.

Entende-se por Cultura de Tecidos de Plantas, como sendo a técnica de se fazer crescer células, tecidos ou órgãos de plantas, num meio aséptico e que contenha todos os nutrientes necessários. Tal técnica tem como base o princípio da totipotencialidade celular, ou seja, a capacidade que cada célula tem em regenerar uma nova planta, quando lhe são fornecidas as condições químicas e físicas apropriadas. Logo, é uma abordagem biotecnológica, na medida em que parte da célula para gerar inovação tecnológica; permite o desenvolvimento de protocolos de laboratório para regenerar plantas intactas e férteis e, desse modo, controlar o processo da morfogênese.

Consideram-se hoje, cinco principais tipos de cultura

de tecidos vegetais:

1) CULTURA DE CALOS

Os calos são obtidos quando um explante de tecido altamente organizado é transferido para meio nutritivo, onde sofre indução para a formação de uma massa celular não diferenciada: o calo.

O balanço hormonal e de nutrientes favorece a diferenciação da massa celular em estruturas organizadas e funcionais. A regeneração de plantas a partir de calos pode ser através de organogênese ou embriogênese.

1.1) ORGANOGÊNESE: A regeneração através de organogênese se inicia através da formação de brotos. A formação destes órgãos não necessariamente deve passar pela fase de calos, pois frequentemente e constantemente tem-se observado organogênese diretamente dos explantes.

O fator mais importante na formação de órgãos em cultura é a quantidade relativa de auxinas e citocininas. Quando a concentração de auxinas é (relativamente as concentrações que induzem a formação de calos) menor que a de citocininas, brotos são formados. Inversamente, induz-se a formação de raízes.

O aumento nos níveis de fosfatos inorgânicos do meio tem aumentado a produção de brotos em algumas culturas.

Aminoácidos (arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina) podem ser vantajosos em meios de multiplicação de órgãos.

Quanto a bases nitrogenadas, efeitos estimulatórios da adenina foram observados na iniciação de brotos em algumas cultu-

produzidas, dependendo da especie e das condicoes de cultura. As plantas produzidas por este metodo apresentariam todas as fases de uma planta de semente natural, logo, passaria por um indesejavel periodo de juvenilidade, no caso de algumas culturas (frutiferas).

Faltam ainda conhecimentos sobre os fatores que controlam o fenomeno da embriogenese, bem como, encontram-se problemas na producao de embrioes de mesmo estadio de crescimento.

2) SUSPENSÕES CELULARES

Consiste em colocar explantes ou transferir calos para um meio liquido, sendo os frascos de cultura mantidos em um agitador rotatorio, o que auxilia a dispercao das celulas e a troca de gases. Na realidade, a suspensao de celulas consiste de agregados, conglomerados e de celulas individuais. Devido ao maior contato entre as celulas e o meio, o seu crescimento e mais intenso do que no meio solido.

Tal procedimento pode ser utilizado como alternativa para o cultivo de plantas no campo, atuando como uma fonte biologica de compostos uteis ao homem e seus animais.

Torna-se necessario o estabelecimento das condicoes otimas para o cultivo das celulas: explante, temperatura, tensao de oxigenio, meio de cultura, etc.. O explante a ser cultivado em suspensao deve apresentar producao do composto especifico que se deseja.

Entre os produtos secundarios do metabolismo celular obtidos por este metodo, sao de importancia: enzimas, alcaloides,

produtos de interesse farmaceutico e corantes.

3) CULTURA DE ORGAOS

Varios orgaos vegetais: raizes, porcoes de caule, embrioes, anteras, ovarios, ovulos, etc. podem ser cultivados em meio apropriado, levando a regeneracao de plantas.

3.1) CULTURA DE EMBRIDES IMATUROS: Tecnicas "in vitro" podem ser utilizadas para o cultivo de embrioes que de outra forma abortariam. Tal abortamento pode ocorrer em funcao do desenvolvimento incompleto em cultivares precoces ou de incompatibilidade genetica em hibridos interespecificos.

Os fatores que influenciam a nutricao, o crescimento e a diferenciacao de eixo embrionario "in vitro" sao varios e devem ser bem conhecidos para obter bons resultados. De maneira geral, quanto mais imaturo for o embriao cultivado, mais complexo devera ser o meio nutriente.

Tal metodo possibilita a recuperacao de plantas hibridas em combinacoes onde normalmente sementes nao sao produzidas ou os embrioes sao abortados, logo, sendo um grande auxilio nos programas de melhoramento genetico vegetal, principalmente em cruzamentos de especies cultivadas com especies selvagens, para introducao de tolerancia a doencas e outros fatores limitantes da produtividade.

3.2) CULTURA DE ANTERAS: Anteras no estadio de microsporo uninucleado sao separadas dos estames de botoes florais esterilizados, e inoculados em meio nutritivo. Plantas jovens mantidas em otimas condicoes de temperatura, luz e nutricao, sao as melho-

res fontes, sendo que a embriogenese é incrementada quando as plantas são pre-tratadas com baixa temperatura.

A maioria das plantas regeneradas desta cultura é haploide, permitindo várias aplicações no melhoramento genético:

- Haploides podem ser utilizados na detecção de genes recessivos e para se obter homozigose mesmo em plantas auto-incompatíveis, dioicas e propagadas vegetativamente.

- A duplicação cromossômica de haploides fornece um método para a rápida recuperação de linhagens homozigotas para produção de híbridos.

- A cultura de haploides, é ainda, muito útil em programas de melhoramento que fazem uso de hibridações distantes, através de alterações na ploidia das espécies que por fim permitem os cruzamentos.

3.3) CULTURA DE OVULOS: É um método utilizado para produção de haploides, bem como, em caso de difícil extração do embrião, pode-se usar a cultura de ovulos fecundados com objetivos análogos a cultura de embriões imaturos.

Sabe-se que o sucesso pode depender muito da idade em que os ovulos foram retirados, e que em certos casos, há necessidade de adição de substâncias bastante complexas ao meio, como por exemplo: água-de-coco, caseína hidrolizada, etc.

4) CULTURA DE MERISTEMAS

Plantas completas podem ser obtidas a partir da cultura aséptica de meristemas. Os meristemas são cultivados em meio nutritivo, cuja composição é importante para au-

mentar a formacao de grande numero de gemas, que darao a parte aerea e permitiraõ formacao de raizes.

Por este metodo, as plantas regeneradas sao geneticamente uniformes, uma vez que nao se passa por estadio de calo, bem como, pela uniformidade de celulas diploides que compoem o meristema.

Ao mesmo tempo, se efetua a limpeza clonal, eliminando virus e outros organismos sistemicos, neste aspecto, o tamanho do explante e de suma importancia (normalmente se utilizam meristemas apicais ou axilares medindo de 0.2 a 0.5 mm de comprimento, dependendo da especie), sendo que, o uso de termoterapia nas "plantas doadoras" contribue para a eficiencia do metodo.

Tal metodo, como parte da micropropagacao, possibilita a clonificacao de plantas sadias num curto espaco de tempo e utilizando relativamente pequenas areas.

5) CULTURA DE PROTOPLASTOS

Os protoplastos sao celulas cuja parede celular foi removida por metodos enzimaticos (celulase, hemicelulase e pectinases) ou mecanicos, e que retem ainda a capacidade de regenera-la e entao crescer e sofrer divisao. As melhores fontes de protoplastos sao tecidos vegetais jovens e calos. Os protoplastos isolados podem ser cultivados assepticamente, produzindo pequenas colonias e regenerando plantas inteiras (principal limitacao na cultura de protoplastos, estando a regeneracao, restrita a poucas especies).

Genes de especies mais distantes podem ser introduzidos

em protoplastos, através da fusão somática de espécies ou gêneros distintos, ou por engenharia genética, isto é, transformação do genoma da planta.

A fusão de protoplastos pode ser espontânea ou induzida por polietilenoglicol (PEG) ou através da eletroporação. Varias porém, são as dificuldades: frequentemente a fusão é incompleta, um ou outro dos genomas é perdido ao longo do processo de regeneração.

Novas descobertas, no entanto, são estimulantes, como a hibridação citoplasmática - produção de Cíbrido - permitindo a introdução de características controladas por organelas (principalmente mitocôndrias e cloroplastos), pela inativação dos núcleos de uns protoplastos (doador de citoplasma) e das organelas de outro grupo (receptor) a ser fundido com o primeiro.

Também, a tecnologia do DNA recombinante, possibilitando o isolamento de genes "individuais", possibilita novas formas de transformar o genoma da planta, pela incorporação destes genes a protoplastos através de : a) Introdução indireta - utilização de plasmídeos (co-cultivação de protoplastos com bactérias do gênero Agrobacterium previamente modificadas para carregar o gene estranho na região T-DNA do seu Ti-plasmídeo, ou Ri-plasmídeo) b) Introdução direta - estes métodos incluem a precipitação com PEG, a fusão de protoplastos com lipossomos (o DNA a ser inserido e encapsulado em lipossomos que o protege da ação hidrolítica das endonucleases do receptor) e a eletroporação.

Com tudo, ainda falta muito caminho a percorrer para que as células vegetais transformadas por DNA estranho produzam

plantas intactas e férteis onde genes de alto interesse econômico agrícola estejam expressos, por quatro principais entraves:

- Identificação de células hospedeiras adequadas para a introdução de DNA;
- Necessidade de se desenvolver vetores apropriados de modo que haja replicação do DNA estranho na célula receptora;
- Necessidade de se utilizar marcadores no DNA estranho que possam ser selecionados e expressos na célula receptora;
- Complexidade do uso da tecnologia do DNA recombinante, diante de características de controle poligenico.

Pelo próprio processo de cultura "in vitro", uma variabilidade genética é criada - variação somaclonal. O conhecimento das causas da variação somaclonal é importante na medida em que se deseja incrementá-la ou suprimi-la segundo os objetivos do processo. Assim, por exemplo, deve ser suprimida no processo de propagação clonal e explorada em seleção de linhagens com resistência ou tolerância a um determinado patógeno ou stress fisiológico. Tal seleção pode ser efetuada "in vitro" e, após regeneração de plantas, aquelas que demonstram a característica desejada são levadas ao campo para completar a fase de avaliação.

A importância desta variação somaclonal para o melhoramento genético, depende entretanto, da facilidade de cultivo "in vitro" da espécie, bem como, da regeneração de plantas de linhagens de células. É questionável também, a estabilidade das variações somaclonais obtidas "in vitro" e a herdabilidade destas novas características nas gerações subsequentes.

A limpeza clonal via meristema, acoplada a micropropagação de clones superiores e a cultura de embriões, em menor escala, já são técnicas consagradas. Quanto a tecnologia do DNA recombinante, da fusão de protoplastos e a utilização da variação somaclonal, muita pesquisa ainda é necessária, porém, resultados bastante promissores destas técnicas são preságios das dimensões do impacto que haverão de ter no futuro.

=====

METODOLOGIAS BASICAS NA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

=====

Para os diversos tipos de cultura "in vitro" ja citados existem metodologias que, pela analogia de principios envolvidos, sao semelhantes no seu proceder.

1) DESINFESTACAO DO EXPLANTE

E uma condicao inviolavel para o estabelecimento e manutencao (logo, para o sucesso) das culturas "in vitro", a inexistencia de qualquer organismo estranho a planta (ou parte desta) em cultivo; Pois o microorganismo pode se sobrepor ao crescimento do explante, destruindo-o, ou entao, pode mudar o meio nutritivo removendo nutrientes e liberando outros produtos metabolicos.

Para tanto, torna-se necessario como medida primaria no processo de cultivo "in vitro", uma correta assepsia do explante a ser utilizado.

Para tal, faz-se uso de desinfetantes; Estes, ao mesmo tempo e na mesma concentracao, devem eliminar do explante, qualquer organismo capaz de causar contaminacao na cultura (principalmente fungos e bacterias), evidentemente, sem afetar negativamente o explante.

Neste proceder, foi consagrado o uso combinado de etanol e hipoclorito de sodio ou calcio (adicionado de um espalhante - Tween 20 - que auxilia a penetracao do agente desinfetante) em concentracao e por tempo variavel segundo diversos fatores a considerar: Especie; tamanho do explante; condicoes de manutencao

da planta fonte; tipo de explante; etc. capazes de interferir na quantidade, aderencia e grau de penetracao do contaminante no orgao ou tecido a ser desinfetado.

Apos a desinfestacao, toda manipulacao deve ser feita em ambiente esteril (camera de fluxo laminar) com instrumentos de trabalho (pinças, bisturi, etc.) limpos e desinfetados.

2) FONTE DE EXPLANTE

Entende-se por explante, como sendo a parte da planta a ser utilizada no cultivo em meio nutritivo, podendo ser raiz, mesofilo foliar, cotiledones, endosperma, tecido reprodutivo, parenquima vascular, etc.

A fonte de explante pode determinar o sucesso ou nao da cultura "in vitro", por isto, antes de selecionar determinado explante para o trabalho, convem compara-los em experiencia preliminar ou pela revisao da literatura, para saber qual o mais apropriado.

Plantas no chamado "estado juvenil" (vigoroso desenvolvimento vegetativo e ausencia de formacao de estruturas reprodutivas), usualmente, dao maior regeneracao que plantas adultas. Alem disto, plantas jovens tem menos acumulo de patogenos.

Convem manter as plantas fonte de explantes em condicoes ideais de solo e fertilizantes, bem como, que possibilitem fornecer as condicoes saasonais requeridas.

Determina tambem, a escolha do explante, a finalidade e tipo de cultura de tecido em questao (mencionado anteriormente).

3) MEIO NUTRITIVO

As plantas em cultura de tecido tem necessidades mais complexas que em estado natural e raramente são autotróficas, por isso, além dos macro e micronutrientes minerais, são necessários vitaminas, carboidratos, aminoácidos e outras substâncias, entre as quais, destacam-se por sua importância, os reguladores de crescimento, que "in vivo" são sintetizados (fit-hormônios) por um órgão da planta.

Os meios variam segundo o gênero, espécie e cultivar utilizado, além do estágio em questão (I-estabelecimento da cultura; II-multiplicação; e III-preparação para reestabelecimento no solo), a fonte de explante e o objetivo a ser alcançado.

Dependendo do caso, o meio pode ser sólido, semi-sólido ou líquido.

Alguns meios necessitam de antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína) para evitar a deterioração de tecidos recém extraídos, ou substâncias capazes de absorver (carvão ativado) metabólitos tóxicos que venham a ser formados pelo explante. Também pode ser adicionado antibiótico para suprimir o desenvolvimento microbiano.

3.1) SAIS MINERAIS: Existem hoje várias "receitas" preparadas por

alguns autores, entre as quais temos: a de MURASHIGE e SKOOG (MS), amplamente utilizado; O de GAMBORG (B⁵); e o de WHITE (o mais simples dos três). - Vide anexo -

Experimentos com distintos tipos de plantas e órgãos tem sido conduzidos com sucesso utilizando-se a fórmula de sais do MS, em parte, devido a sua alta concentração salina. Alguns

autores julgam que certos ions (em particular o NH_4^+) possam estar em concentracoes muito altas. A adicao de 170 mg/l de NaH_2PO_4 a formula MS tem sido benefica para alguns casos.

A formula MS e particularmente alta em micronutrientes, quando comparada com outras formulacoes.

3.2) CONSTITUENTES ORGANICOS: Sendo as celulas "in vitro", com raras excessoes, autotroficas, a adicao de fontes de carbono (sacarose, glicose) e absolutamente necessaria.

Quanto a vitaminas, a tiamina HCl e essencial. O mio-inositol nao e essencial, contudo, tem mostrado claros efeitos beneficos. A necessidade das outras vitaminas (acido nicotinico e piridoxina principalmente) nao esta bem demonstrada, sendo usadas mais por precaucao.

Quanto a aminoacidos (arginina, acido aspartico, acido glutamico e tirosina), podem ser vantajosos em meio de multiplicacao de orgaos. Algumas vezes suas amidas sao mais eficientes. Deve-se usar somente o isomero L, pois o D e usualmente sem efeito e anula o L. Como os aminoacidos frequentemente se antagonizam entre si, podem ocorrer efeitos mais prejudiciais do que beneficos.

Bases nitrogenadas (purina, adenina) podem ser desejaveis na iniciacao de brotos em algumas culturas. No caso de acido citadilico e guanilico, e confirmado o aumento de crescimento de calos.

Dentre os componentes organicos, os reguladores de crescimento sao os mais criticos, pois regulam a diferenciacao de tecidos e celulas e metabolismo secundario das culturas.

* Auxinas: promovem crescimento por efeito de alongamento celular. A mais usada é o ácido 3-indolacético (AIA) pois mostra poucos efeitos adversos à organogênese. O ácido naftalenoacético (ANA) é mais forte e não se inativa tão rapidamente, induzindo a formação de raízes mais precocemente. O ácido indolbutírico (AIB) é mais usado para induzir o enraizamento nas brotações e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é mais potente e suprime fortemente a organogênese, sendo útil para a manutenção de calos.

* Citocininas: causam divisão e alongamento celular. A mais ativa das citocininas é a N⁶-isopentiladenina (Zip.), e entretanto a mais cara depois da zeatina (citocinina natural). A benzilaminopurina (BAP ou BA) e 6-furfurilaminopurina (cinetina) tem efeito de anular a dominância apical das gemas axilares e de promover proliferação de brotos "in vitro".

* Giberelinas: causa elevação de síntese de DNA e RNA, logo, indiretamente o alongamento celular. A mais utilizada é o ácido giberélico (GA3) que embora estimule o crescimento de órgãos, reprime a iniciação do processo de formação dos órgãos.

As auxinas e citocininas interagem na sua ação direcionando a diferenciação celular e morfogênese, sendo por isto, usadas no controle da diferenciação celular e da organogênese em tecidos e órgãos de cultura:

- Uma concentração relativamente alta de citocinina induz a formação de brotos e suprime o enraizamento.
- Uma concentração relativamente alta de auxina favorece a iniciação de raízes enquanto reprime a formação de brotos.

4) CONDICÖES AMBIENTAIS

Os principais fatores são luz e temperatura.

A iluminação de culturas de plantas deve ser considerada em termos de intensidade, período de luminosidade e qualidade.

Em cultura de tecido, a fotossíntese não é uma atividade necessária, desde que carboidratos estejam presentes no meio. A luz, contudo, é necessária para regular certos processos morfo-genéticos (formação de brotos, iniciação de raízes, embriogênese, etc.).

Quanto a intensidade, valores de 1000 a 4000 lux têm sido apropriados nos estágios I e II, sendo mais altos no III. Lâmpadas fluorescentes são mais eficientes na conversão de energia elétrica em energia luminosa, por isto, mais utilizadas.

O período de iluminação pode influenciar o desenvolvimento de culturas de tecidos de plantas que normalmente já apresentam sensibilidade ao fotoperíodo, principalmente no que diz respeito a organogênese.

Quanto a qualidade de luz, ocorrem variações na resposta de diferentes espécies a determinadas faixas de espectro de luz, levando à conclusão de que a chave dos processos organogênicos em cultura de tecidos são fenômenos fotomorfogênicos, muito provavelmente regulados por fitocromo.

Respectivo a temperatura, é regra geral manter as culturas em temperatura média de 25 C. Sendo porém necessário, explorar maiores variações, principalmente nos casos de cultura de calos e suspensões celulares, bem como, na "quebra de dormência"

de plantulas "in vitro" (ex: maca).

=====
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS
=====

1) ATIVIDADES GERAIS

1.1) LIMPEZA DE MATERIAL: Todo material (exceto pinças, bisturis e outros instrumentos) antes de ser lavado passa por uma esterilização em autoclave durante 30 minutos, a 1.5 atm e 121 C, para evitar contaminações futuras.

Apos esterilização, torna-se necessário evitar a presença de substâncias indesejáveis no meio de cultura, para tanto, faz-se uma lavagem com uso de detergente e escovas adequadas e, logo apos, enxagua-se o material em água corrente e por ultimo em água destilada.

1.2) PREPARO DE SOLUCOES ESTOQUE: Para facilitar as operações de preparo de meio, tanto os sais minerais como as vitaminas e reguladores de crescimento são conservados em soluções de concentração conhecida (necessariamente superior as concentrações usuais nos meios), desta forma, evita-se estar pesando cada composto no momento da elaboração do meio de cultura.

Ainda, para diminuir o numero destas soluções estoques, consequentemente, diminuir o numero de pipetagens necessárias ao preparo de meio, os sais minerais são agrupados em 6 soluções e as vitaminas em 1 solução; Ficando os reguladores de crescimento (por serem a principal variável nos experimentos) em estoques puros de diversas concentrações básicas (Ex: 1mg/20ml; 10mg/100 ml; 50mg/100ml).

No preparo destas soluções, os compostos constituintes

são pesados em balança adequada e dissolvidos em água destilada até completar o volume desejado na concentração.

No caso das soluções estoques de citocinina, o regulador deve ser dissolvido com solução de HCl. Para as auxinas, utiliza-se Na OH.

Para a solução estoque constituída de Fe, é necessário o uso de Na₂ EDTA, pois possibilita a solubilidade deste elemento em uma ampla faixa de pH; Assim procedendo, torna-se necessário um aquecimento prévio até 50 C para diluição dos componentes.

A conservação destas soluções é feita em geladeira, onde se encontram protegidas do calor e luz.

1.3) PREPARO DO MEIO DE CULTURA: Por simples regra de 3, calculam-se as respectivas quantidades de soluções estoques de minerais, vitaminas e reguladores de crescimento necessários ao meio.

Calcula-se e pesa-se a quantidade necessária de agar (caso o meio seja sólido) e de sacarose.

Pipetam-se as quantidades de soluções estoques, adiciona-se a sacarose e completa-se com água destilada até o volume de meio preestabelecido. Em seguida, mede-se e ajusta-se o pH do meio em 5,8 ⁺ 0,01 com o uso de pHmetro e soluções de HCl e Na OH

Logo após, coloca-se a quantidade pesada de agar e aquece-se até o cozimento do mesmo (quando ocorre a homogeneidade da solução).

Uma vez cozido, o meio pode ser distribuído para os recipientes (tubos ou frascos), tampados com papel alumínio e autoclavados durante 20 minutos a 121 C e 1.5 atm pressão.

2) ATIVIDADES RELATIVAS AO CULTIVO "IN VITRO" DE M. velutina

2.1) INTRODUCAO: Estudos farmacologicos pre-clinicos, realizados com extratos brutos obtidos da tubera de Mandevilla velutina (popularmente conhecida como Jalapa) demonstraram a existencia de principios ativos capazes de inibir seletivamente as acoes da Bradicinina (BK) e outras cininas.

A bradicinina e um peptideo, composto por 8 aminoacidos, que e liberado no sangue humano pela acao cininogenesica do veneno de Jararaca (Bothrops jararaca), causando hipotensao que pode conduzir a morte do individuo envenenado. Alem disto, foi comprovado o envolvimento da BK e outras cininas em diversas funcoes patologicas, como: producao de dor, inflamacao, asma, pancreatite, etc..

Apesar da relevancia destes fatos, poucos estudos foram feitos com M. velutina. Assim sendo, urge desenvolver trabalhos de pesquisa que possibilitem a utilizacao da especie, tornando viavel seu cultivo, e portanto, possibilitando a exploracao racional do seu potencial farmacologico.

Considerando os perigos do extrativismo da planta no seu habitat, bem como, a necessidade de material propagativo de alta qualidade em curto espaco de tempo, para viabilizar o cultivo extensivo; O cultivo "in vitro" da especie justifica-se pelo uso de tecnicas de micropropagacao, bem como, por possibilitar o estudo do potencial de utilizacao de calos e suspensoes celulares na extracao dos produtos de interesse farmacologico.

2.2) ATIVIDADES RELATIVAS AO ESTUDO DE MEIOS PARA PROLIFERACAO DE CALOS VISANDO A OBTENCAO DE PRINCIPIOS ATIVOS DE INTERESSE FARMACOLOGICO: Dentro desta item, dois experimentos foram realizados:

2.2.1) CULTIVO "IN VITRO" DE CALOS: Nesta atividade teve-se por objetivo cultivar calos para posterior utilizacao em experimentos de:

- Suspensoes celulares;
- Avaliacao da taxa de crescimento dos calos; e
- Inducao de embriogenese somatica e organogenese em calos.

Com este intuito, foi preparado meio basico MURASHIGE e SKOOG (MS) acrescido com: mio-inositol (100mg/l), acido nicotnico (0.5mg/l), piridoxina HCl (0.5mg/l), tiamina (0.5mg/l), glicina (2.0mg/l), sacarose (3.0 %), agar (0.6 %), zeatina (3.0mg/l), benzilaminopurina (2.0mg/l) e acido naftalenoacetico (2.0mg/l).

Apos desinfestacao com alcool 70 % durante 10 segundos e Agua sanitaria (Qboa) 40 % durante 10 minutos, pedacos de caule (com 0.5cm) divididos ao meio longitudinalmente foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml do referido meio.

Como a inoculacao dos meios foi realizada no final do estagio, nao foi possivel acompanhar o crescimento de calo nos explantes.

2.2.2) CULTIVO "IN VITRO" DE SEMENTES: E sabido que para a obtencao de produtos metabolicos de culturas "in vitro", o material vegetal a ser cultivado deve ser aquele que normalmente apresenta producao do composto especifico que se deseja e que nor-

malmente e uma das principais (senao a principal) fontes biologicas do produto.

Considerando este aspecto, necessario se faz o cultivo de tecido de tubera de *M. velutina*; Problemas de desinfestacao deste explante, porem, tem sido um grande empecilho para o sucesso do seu cultivo. Assim sendo, surge como alternativa, o cultivo de sementes da especie, em meio asseptico, como forma de se obter uma fonte de explante (seccoes de tubera) livre de contaminantes, possibilitem o desenvolvimento de calos para posterior avaliacao do seus niveis de principios ativos.

Neste sentido, durante o estagio, foi preparado meio MS com concentracoes de vitaminas, sacarose e agar ja citados no item 2.2.1, e sem presenca de reguladores de crescimento.

Pela falta de sementes no momento da realizacao do estagio, nao foi possivel utilizar o meio preparado.

2.3) MICROPROPAGACAO DE *M. velutina*: Relativo a este assunto, varias foram as atividades desenvolvidas durante o estagio.

2.3.1) AVALIACAO DE EXPERIMENTO PREVIO DE MULTIPLICACAO DE BROTOS

"IN VITRO": Varios meios de cultura tinham sido inoculados com 1.0 segmento nodal de *M. velutina*, provenientes (apos sucessivas repicagens) da cultura de meristemas apicais no meio MS (vide item 2.2.1) com 0.5mg/l de BAP + 0.01mg/l de ANA + 0.5mg/l de GA3 + 0.05mg/l de Zip.

Os meios do experimento previo avaliado, eram:

A = MS + 1.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA + 0.1 mg/l GA3

B = MS + 0.5 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA + 0.5 mg/l GA3 + 0.05 mg/l Zip + 3.0 g/l Carvao Ativado (Abrev.: CA)

C = MS + 2.0 mg/l BAP

D = MS + 0.05 mg/l BAP + 3.0 g/l CA

E = MS + 0.5 mg/l BAP + 3.0 g/l CA

F = MS + 1.0 mg/l BAP + 3.0 g/l CA

G = MS + 0.05 mg/l BAP + 0.05 mg/l ANA + 3.0 g/l CA

H = MS + 0.05 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA + 3.0 g/l CA

I = MS + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA + 3.0 g/l CA

J = MS + 0.5 mg/l GA3

K = MS + 1.0 mg/l GA3

L = MS + 2.0 mg/l GA3

M = MS + 2.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l ANA + 0.05 mg/l GA3

N = MS + 50.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l AIA

* Considera-se MS o meio com as concentrações de minerais (vide anexo) propostas por Murashige & Skoog, e de vitaminas, agar e sacarose mencionadas no item 2.2.1

A capacidade indutiva de multiplicação dos meios foi avaliada segundo 4 parâmetros:

- Presença de calosidade: Característica indesejável, uma vez que esgota o meio mais rapidamente e pode "degenerar" os feixes vasculares das brotações, prejudicando sua capacidade de absorção de nutrientes.
- Número de nos totais por tubo: Sendo a multiplicação da espécie feita através de corte e repicagem de nos, o número de nos por tubo é uma característica diretamente proporcional a taxa de multiplicação "in vitro" da espécie.
- Número de brotos por tubo: Quanto maior for o número de brotos,

potencialmente maior sera o numero de nos, logo, melhor sera a taxa de multiplicacao "in vitro".

- Altura do maior broto: Esta caracteristica fornece uma ideia do vigor da plantula, logo, do maior ou menor potencial de brotacao e desenvolvimento das gemas axilares dos nos quando repicados.

Pela avaliacao feita, obteve-se o seguinte quadro de medias por tratamento:

PARAMETRO	Repeticao	Calosidade (*)	Numero nos (un.)	Numero broto (un.)	Altura do maior bro. (cm)
A	5.0	2.4	9.4	1.8	2.8
B	8.0	0.6	10.1	1.9	5.1
C	5.0	1.0	19.4	3.4	5.9
D	3.0	2.0	2.0	1.7	0.3
E	3.0	0.7	1.7	0.7	0.4
F	3.0	0.0	1.3	0.7	0.4
MEIO G	3.0	1.7	4.3	2.7	0.5
H	3.0	0.7	1.7	1.0	0.5
I	5.0	0.8	7.0	2.0	2.4
J	2.0	1.0	3.5	2.0	0.7
K	2.0	0.0	5.0	1.5	1.8
L	2.0	0.0	11.0	2.0	1.8
M	2.0	3.0	1.5	0.5	0.25
N	3.0	2.7	4.0	2.5	0.65

* Criterio de avaliacao: 0.0 - sem calo
 1.0 - calo 3.0mm de diametro
 2.0 - calo com 3.0 a 5.0mm de diametro
 3.0 - calo 5.0mm de diametro

Pelo quadro, nota-se que o meio C, apesar de apresentar alta calosidade, foi o que melhores resultados alcançou. Em segundo lugar, encontra-se o meio B, este, somente difere do meio no qual os inoculos foram repicados, pela presença de carvão ativado: provavelmente responsável pela diminuição da calosidade basal, mas também, do potencial indutivo de multiplicação.

Finalmente, são bons meios o A, I e L. Quanto a este último, em comparação com os meios J e K, ficou evidenciada a ação positiva de doses crescentes de giberelina isoladamente.

Cabe resaltar que para a discussão dos resultados não foi necessária a realização de testes estatísticos de comparação de médias, devido a característica de pre-teste do experimento (experimento prévio), bem como, ao diferente e baixo número de repetições por tratamento.

2.3.2) PREPARO DE NOVOS MEIOS PARA MULTIPLICAÇÃO E ISOLAMENTO DE

MERISTEMAS: A partir das conclusões do item 2.3.1, elaboraram-se meios de cultura com nova variação entre auxinas e citocininas, visando obter maior taxa de multiplicação das brotações, como também, para testá-los em regeneração da plantas através do cultivo de meristemas apicais.

Assim, foi preparado meio MS acrescido de vitaminas, sacarose e agar (item 2.2.1), com diferentes concentrações de reguladores de crescimento:

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)		
	1.0	2.0	5.0
0.0	O	P	Q
1.0	R	S	T
2.0	U	V	W

Também, foi preparado um meio com as maiores concentrações de reguladores de crescimento dos meios C, B, A, I e L do experimento avaliado no item 2.3.1:

$$X = MS + 2.0mg/l \text{ BAP} + 0.5mg/l \text{ ANA} + 2.0mg/l \text{ GA3} + 0.05mg/l \text{ Zip}$$

Buscando avaliar a açao isolada de variacoes na concentracao dos reguladores de crescimento (tanto na inducao de multiplicacao, como de regeneracao de plantas atraves de meristema) foram preparados meio basico MS com diferencas na concentracao dos reguladores, partindo das proporcoes dos mesmos, no meio B (item 2.3.1), em vista dos bons resultados ja comprovados deste meio na inducao de multiplicacao, como do desenvolvimento de meristemas, e tambem, por estar constituido com 4 diferentes reguladores.

MEIOS	REGULADORES CRESCIMENTO (mg/l)			
	BAP	ANA	GA3	2ip
B	0.5	0.01	0.5	0.05
B1	2.0	0.01	0.5	0.05
B2	4.0	0.01	0.5	0.05
B3	0.5	0.01	1.0	0.05
B4	0.5	0.01	2.0	0.05
B5	0.5	0.01	0.5	0.10
B6	0.5	0.01	0.5	0.50
B7	0.5	0.50	0.5	0.05
B8	0.5	1.00	0.5	0.05

2.3.3) PROPAGACAO DE M. velutina: Para a implantacao de experimentos usando os meios preparados (item 2.3.2), quantidades relativamente grande de nos cauliculares de tamanho adequado seriam necessarios.

Este fato, aliado a necessidade de bloquear o meio de proveniencia destes explantes, impossibilitou o uso das brotaoes obtidas do experimento avaliado no item 2.3.1 para inoculacao dos novos meios a serem testados.

Assim, foi necessario a elaboracao de um meio para mul-

tiplicar e igualar as condicoes de origem das brotacoes presentes (evitando futuros erros causados pelas diferentes influencias do meio de origem sobre o propagulo repicado), tanto o meio C, como o B (item 2.3.1), seriam apropriados para este fim, uma vez que alcancaram bons resultados (vide avaliacao); Optou-se pelo meio B pois era o meio com melhores resultados na cultura de meristemas, e por isto, num processo de micropropagacao, seria o meio de onde viriam as brotacoes a multiplicar.

Aproveitando a necessidade de preparo e inoculacao de meio B, montou-se um ensaio para observar as possibilidades de substituicao da sacarose por acucar cristal refinado (menor custo que a sacarose), assim, prepararam-se 250 ml de meio B (MS + 0.5mg/l BAP + 0.01mg/l ANA + 0.5mg/l GA3 + 0.05mg/l Zip) e 200ml do mesmo meio, so que com acucar cristal (3.0 %) no lugar da sacarose da formulacao MS.

Uma vez pronto, os tubos contendo 3.0 ml de meio, foram inoculados com segmentos nodais de brotos de *M. velutina* obtidos do experimento avaliado no item 2.3.1 .

3) ATIVIDADES RELATIVAS AO CULTIVO "IN VITRO" DE *F. selloviana*

3.1) INTRODUCAO: A Feijoa selloviana, planta da familia das mir-

taceas, nativa nas regioes serranas de Santa Catarina, e uma fruteira que apresenta grande potencial de exploracao agricola.

A falta de adequado numero de mudas de boa qualidade, bem como, de estudos a respeito da sua propagacao, nutricao, necessidades climaticas, etc. impossibilitam tal exploracao.

A cultura de meristemas da especie, aliada a metodos de micropropagacao, e uma das melhores formas para a clonificacao de

mudas sadias, de alto potencial produtivo e com pequena juvenili-
dade, logo, possibilitando a implantacao de pomares uniformes pa-
ra o estudo cientifico das qualidades e requerimentos da especie.

3.2) FORMULACAO DE MEIOS PARA O CULTIVO DE MERISTEMAS: Ensaio
preliminares de isolamento de meristemas desta especie nos
meios:

I :MS + 0.5mg/l BAP + 0.01mg/l ANA + 0.5mg/l GA3 + 0.05mg/l Zip

II:MS + 1.0mg/l BAP + 0.01mg/l ANA + 0.1mg/l GA3

mostraram resultados promissores no uso desta tecnica, conseguin-
do o desenvolvimento dos meristemas cultivados em ambos meios,
com maior destaque para o meio II.

Com estes resultados, e pela necessidade de maior apro-
fundamento na avaliacao do potencial morfogenico do cultivo de
meristemas desta especie, novos meios foram preparados: Concen-
tracoes de sais minerais do MS, acrescimo de vitaminas, sacarose,
agar (vide item 2.2.1) e diferentes concentracoes de regulado-
res de crescimento:

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)			GA3 (mg/l)
	1.0	3.0	6.0	
0.0	III	IV	V	0.1
0.1	VI	VII	VIII	0.1
1.0	IX	X	XI	0.1

3.3) ISOLAMENTO DE MERISTEMAS DE *F. selloviana*: Apenas visando a
obtencao de plantas de *F. selloviana*, 15 meristemas foram i-
noculados no meio II. Para tanto, gemas apicais de plantas manti-

das em casa de vegetacao foram coletadas e desinfetadas em mesa de fluxo laminar, seguindo a metodologia: Imersao em alcool 70 % durante 10 segundos; Imersao em Oboa (agua sanitaria) 40 % por 10 minutos; e enxague, por 4 vezes, com agua destilada e esterilizada.

Uma vez feita a desinfestacao do explante, procedeu-se na retirada do meristema: numa placa de petri, com o uso de lupa esteroscópica, segura-se com uma pinça a gema e com outra, vai se retirando os apendices (primordios foliares) ate descobrir a cupula meristemática com 2 ou 3 apendices; Com bisturi, corta-se cuidadosamente pela base esta estrutura e se deposita no tubo com meio nutritivo, concluindo o processo de isolamento do meristema.

Apos devidamente tampados e etiquetados, os tubos contendo os meristemas foram levados a câmara de fitotron, e mantidos a temperatura constante de 25 C, 4000 lux e 75 % de UR.

4) OUTRAS ATIVIDADES

Alem das atividades relatadas, varias outras foram as ocupacoes durante o estagio, que por nao terem sido mencionadas nos objetivos do projeto de estagio, nao foram esmiuçadas neste relatorio; Nao por isso, careceram de importancia.

Resumidamente, foram atividades do estagio:

- Mudanca e organizacao preliminar do laboratorio de cultura de tecidos vegetais (CCA/UFSC) no seu novo espaco fisico.
- Preparo da area e plantio de tuberas de *M. velutina* coletadas a campo.
- Nivelamento e capina da area para instalacao do viveiro (som-

brite) de mudas previsto no projeto M. velutina

- Cultivo "in vitro" de seccoes de folha de tres variedades de
Violeta Africana

- Acompanhamento de outros projetos de pesquisa desenvolvidos no
laboratorio, com micropropagacao de Canela Sassafras, Abacaxi,
Erva Mate, e de enraizamento de M. velutina "in vitro".

- Ensaio de inducao de brotacoes em tuberas de M. velutina, com
diferentes doses de giberelina (GA3).

- Elaboracao do relatorio anual do bolsista do CNPq.

=====
CONCLUSAO
=====

Os avancos da ciencia na area biotecnologica abrem novas perspectivas para a solucao dos problemas da agricultura nacional e mundial.

O estabelecimento de uma politica que defina diretrizes governamentais na area de biotecnologia agropecuaria constitui componente fundamental de apoio ao desenvolvimento agricola.

Hoje a nossa responsabilidade cresceu muito em relacao a falta de alimentos, nao so porque conhecemos melhor a fome e quem e atingido por ela, mas tambem porque temos a possibilidade concreta de enfrentar o problema.

Demagogia seria porem, afirmar que esta na biotecnologia a solucao da falta mundial de alimentos, no entanto uma coisa e certa: grande sera seu impacto nesta tentativa.

=====

TEXTOS CONSULTADOS

=====

- * BIANCO, V. - O paraíso da biotecnologia. Revista Cidade Nova. Nú 11-12, NOV/DEZ. 1987.
- * CALDAS, L.S. e GRATTAPAGLIA, D. - Aplicação da biotecnologia na fruticultura, presente e futuro. Revista Brasileira de Fruticultura, Vol 8 - Nú 3. 1986.
- * CROCOMO, O.J. e CABRAL, J.B. - A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais. Módulo I-3 (curso de cultura de tecidos vegetais).
- * FAGUNDES, S.R.F. - Política de biotecnologia do Ministro da Agricultura. Resumos do 2º Simposio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais - 6 a 9 outubro, Brasília. 1987.
- * FERNANDES, M.I.B. de M. - Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. Curso de Atualização em Genética - CNPT/EMBRAPA, Passo Fundo. RS.
- * PETERS, J.A. - Utilização de biotecnologia no melhoramento de fruteiras. Revista Brasileira de Fruticultura, Vol 8 - Nú 3. 1986.

=====

AUTOAVALIACAO DE APROVEITAMENTO

=====

Apesar de ter realizado o estagio no mesmo laboratorio em que venho desenvolvendo pesquisa ha 2 anos, logo, perdendo a oportunidade de conhecer outros laboratorios, pessoas e pesquisas no que diz respeito a cultura de tecidos vegetais, acredito ter sido a melhor opcao, uma vez que foi possivel dar grandes passos no projeto de pesquisa que venho desenvolvendo, bem como, por guardar a chance de estagiar em outro local, durante o periodo util do ano, quando os pesquisadores estejam presentes e trabalhando em tempo integral (fato dificil de ocorrer durante o periodo de ferias).

=====

PROGRAMACAO DIARIA DESENVOLVIDA

=====

Como a parte de especificacao dos trabalhos desenvolvidos ja foi bastante esmiucada, nesta parte, apenas sera mencionado resumidamente a principal atividade desenvolvida em cada dia (8.0 hs.) de estagio, portanto, nao podera ser avaliada como indicadora de quantidade e qualidade de trabalhos desenvolvidos, mas como simples demonstracao de distribuicao cronologica dos trabalhos.

- 1º dia: Mudanca do laboratorio
- 2º dia: Mudanca do laboratorio e organizacao de material
- 3º dia: Organizacao do laboratorio e limpeza geral
- 4º dia: Autoclavagem e limpeza de vidraria e instrumentos de trabalho
- 5º dia: Avaliacao de experimento previo de multiplicacao "in vitro" de M. velutina
- 6º dia: Idem 5º
- 7º dia: Preparo de meios para multiplicacao e, isolamento de me-
ristemas de M. velutina (meios O, P, Q, R, S, T, U, V, W
e X)
- 8º dia: Idem 7º
- 9º dia: Preparo de meios para multiplicacao e, isolamento de me-
ristemas de M. velutina (meios B, B1, B2, B3, B4, B5, B6
B7 e B8)
- 10º dia: Idem 9º

- 11^o dia: Limpeza de vidraria
- 12^o dia: Preparo do solo para plantio de M. velutina
- 13^o dia: Plantio das tuberas de M. velutina
- 14^o dia: Preparo de meios para: proliferaçao de calos; cultivo de sementes; e para multiplicaçao de brotaçoes (ensaio com sacarose x acucar cristal) de M. velutina
- 15^o dia: Idem 14^o
- 16^o dia: Preparo do terreno para instalaçao do viveiro de mudas.
- 17^o dia: Preparo de meio para cultivo de meristemas de Feijoa seloviana (meios III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e XI)
- 18^o dia: idem 17^o
- 19^o dia: Autoclavagem e limpeza de material
- 20^o dia: Ensaio com brotaçao de tuberas de M. velutina sob açao de gibberelina. Isolamento de meristemas de F. seloviana em meio I
- 21^o dia: Repicagem e multiplicaçao de brotos de M. velutina em meio preparado no 14^o dia. Cultivo de seccoes de folha de violeta africana
- 22^o dia: Cultivo de seccoes de caule e sementes de M. velutina em meios preparados no 14^o dia
- 23^o dia: Autoclavagem e limpeza de material

=====
 ANEXO
 =====

Tabela: Concentrações de sais minerais propostas por tres autores
 Murashige e Skoog; Gamborg; e White.

MACRO NUTRIENTES	MS		B5		WHA	
	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l
NH4 NO3	20.6	1650	-	-	-	-
K NO3	18.8	1900	25	2500	0.8	80
Ca Cl2.2H2O	3.0	440	1.0	150	-	-
Mg SO4.7H2O	1.5	370	1.0	250	3.0	737
KH2 PO4	1.25	170	-	-	-	-
(NH4)2 SO4	-	-	1.0	134	-	-
N2 H2 PO4.H2O	-	-	1.1	150	0.12	19
Ca (NO3)2.4H2O	-	-	-	-	1.2	288
K Cl	-	-	-	-	0.9	65
Na2 SO4	-	-	-	-	1.4	200
MICRO NUTRIENTES						
K I	5	0.83	4.5	0.75	4.5	0.75
H3 BO3	100	6.3	50	3.0	(25)	(1.5)
Mn SO4.4H2O	100	22.3	-	-	29.8	6.65
Mn SO4.H2O	-	-	60	10	-	-
Zn SO4.7H2O	30	8.0	7	2.0	9.3	2.67
Na2Mo O4.2H2O	1.0	0.26	1.0	0.25	-	-
Mo C ³⁺	-	-	-	-	(0.007)	(0.0001)
Cu SO4.5H2O	0.1	0.025	0.1	0.025	(0.004)	(0.001)
Co SO4.6H2O	0.1	0.025	0.1	0.025	-	-
Fe2 (SO4)	-	-	-	-	6.3	2.5
Na2 EDTA	100	37.3	100	37.3	-	-
Fe SO4.7H2O	100	27.8	100	27.8	-	-