

MICROPROPAGAÇÃO

O CULTIVO *IN VITRO* DE CALOS DE CENOURA

O consumo da raiz da cenoura (*Daucus carota*, família Apiaceae) data do tempo dos Romanos. Documentos do período medieval mostram que as cenouras eram brancas ou púrpura. No século XVI, uma mutação deu origem a uma variedade de cor laranja, selecionada por horticultores holandeses como homenagem à casa de Orange. Hoje essa variedade é a mais frequentemente encontrada.



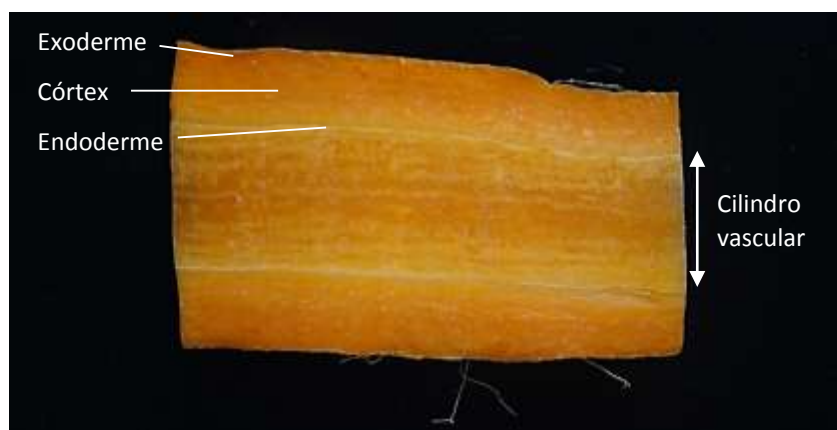
Em 1958, cultivando explantes de cenoura em água de coco, dentro de um dispositivo rotatório, F. C. Steward mostrou a totipotência das células vegetais. Esse trabalho inovador abriu as portas para o cultivo de tecidos vegetais e para a regeneração de plantas modificadas por engenharia genética.

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE CALOS DE CENOURA

Muitas das plantas cultivadas não podem ser propagadas diretamente por multiplicação vegetativa. Contudo, explantes de raiz colocados em um meio com os nutrientes adequados podem dar origem a um calo, que é uma massa de células não diferenciadas. No calo aparecem, eventualmente, embrióides que podem ser transferidos a um meio de diferente composição, onde se desenvolverão regenerando a planta inteira.

Um corte longitudinal de cenoura (Figura 1) mostra uma fina epiderme com pelos radiculares, o córtex de tecidos fundamentais e o endoderme. O cilindro vascular está rodeado pelo periciclo, que forma as raízes laterais. Dentro encontram-se os vasos do xilema e do floema), o câmbio que os origina e tecido parenquimatoso.

Figura 1. Corte longitudinal de raiz de cenoura



BIBLIOGRAFIA

DODDS J.H., ROBERTS L.W. Experiments in plant tissue culture, third edition. Cambridge, Cambridge University Press, 1995

MALAJOVICH M.A. e MANN V.S. Micropropagação. Guia 80: *O laboratório de ensino*; Guia 85: *A desinfecção dos instrumentos*; Guia90: *A desinfecção dos explantes* e Guia 96: *Os meios de cultivo*. <http://www.bteduc.bio.br>

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE CALOS DE CENOURA

ATIVIDADE PRÁTICA

OBJETIVO: Cultivar explantes de tecidos de cenoura, *in vitro*.

MATERIAIS

Cenoura, faca, azulejo, frasco desinfetante com água sanitária 50%, 3 frascos com água estéril, pinças, papel toalha, béquer com álcool 95^o, duas placas de Petri com papel toalha estéril, 4 frascos com meio nutriente estéril *, palitos estéreis, álcool 70^o, bico de Bunsen (opcional).

* O meio nutriente (Murashige&Skoog ou Taji) é uma solução de sais minerais às quais se adiciona sacarose (1 a 5%), ágar (0,7%) e água de coco, como indicado nos Guias 111: *Micropropagação: meios clássicos* e 112: *Micropropagação: meios alternativos*.

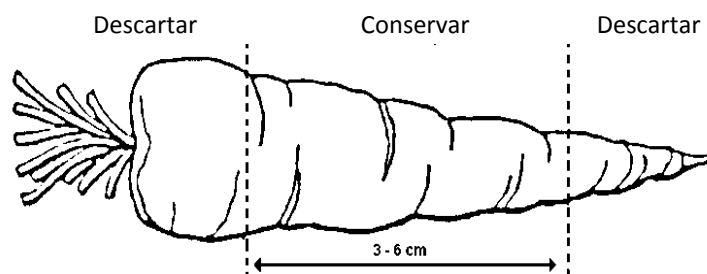
PROCEDIMENTO

A limpeza do lugar de trabalho é fundamental, assim como a higiene das mãos. O lugar de trabalho será desinfetado com álcool 70^o. Os participantes lavarão muito bem as mãos e os antebraços com água e sabão, antes de passar álcool 70^o. Cuidado! O álcool é inflamável. Esterilizar o material contaminado antes de descartá-lo.



1. Esterilização da superfície da cenoura

- Em um azulejo bem limpo, cortar com uma faca um pedaço de cenoura de 3 a 6 cm, descartando ambas as extremidades da raiz.



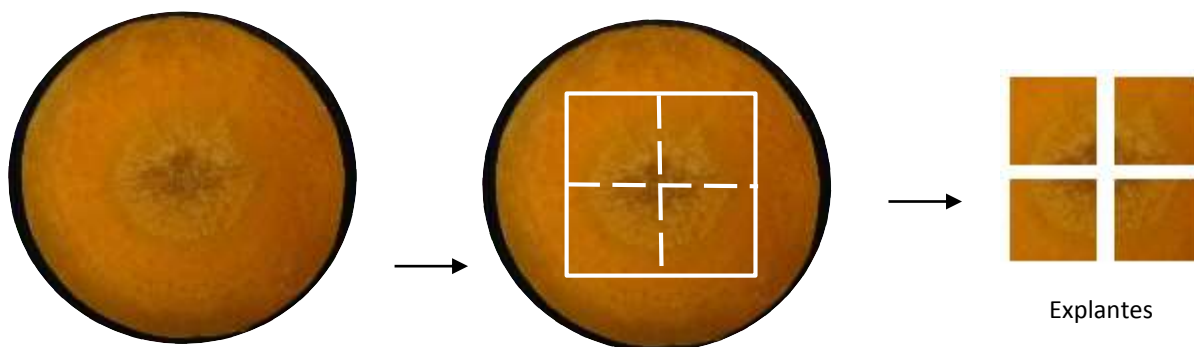
- Raspar para retirar a epiderme e marcar com algum corte a extremidade inferior da raiz.

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE CALOS DE CENOURA

- Desinfetar durante 20 a 30 minutos em água sanitária (hipoclorito de sódio) diluída à metade (50%) e com uma gota de detergente.
- Lavar 3 vezes em água estéril durante 1, 3 e 5 minutos, tendo a precaução de limpar previamente o frasco e a tampa com álcool.
- Agitar suavemente durante todo o procedimento.

2. Obtenção dos explantes

- Sempre em condições assépticas, transferir o pedaço de cenoura a uma placa de Petri com papel toalha estéril para eliminar as partes queimadas, com uma faca ou bisturi estéril.
- Transferir novamente o pedaço de cenoura a uma segunda placa de Petri com papel de filtro estéril e cortar uma rodela fina de 1 a 2 mm de espessura.
- Separar o cilindro vascular e corta-lo em 4 partes, como indicado abaixo:



3. Estabelecimento da cultura

Em condições assépticas, semear os quatro explantes mantendo a polaridade, nos frascos com meio nutriente.

4. Incubação

A 25 ° C, na escuridão.

5. Subcultura ou repique

Sempre em condições assépticas, descartar mensalmente o tecido necrosado e transferir os explantes a meio novo. Depois de um tempo, transferir os explantes a um meio nutriente contendo sais minerais e sem água de coco, e incubar na luz.

NOSSO COMENTÁRIO

Trata-se de um experimento clássico, que dá bons resultados. A maior dificuldade está na obtenção do explante, porque uma vez que se utiliza um meio contendo sacarose e água de coco, o trabalho terá que ser muito rigoroso para manter as condições assépticas e evitar as contaminações.

Por outro lado, como pode resultar difícil diferenciar o crescimento incipiente do calo de uma contaminação bacteriana, acrescentamos na figura 2 várias imagens de calos em diversas etapas de desenvolvimento. A menos de observar claramente uma contaminação fúngica ou bacteriana, é preferível aguardar um pouco antes de eliminar o material.

A cenoura não é a única raiz que pode originar calos. Os testes com batata doce (*Ipomoea batatas*) foram positivos (Figura 3)

COMO MONTAR UM PROJETO

Testar com outras raízes de dicotiledôneas, como por exemplo, batata doce (*Ipomoea batatas*), ou batata inglesa (*Solanum tuberosum*).

Comparar o crescimento e diferenciação dos tecidos em meios de diferente composição.

MICROPROPAGAÇÃO / CULTIVO *IN VITRO* DE CALOS DE CENOURA

Figura 2. Calos de cenoura

A: Início da formação do calo; B: proliferação de um tecido esbranquiçado opaco; C: fragmento original do explante rodeado de tecido não diferenciado; D: transferido a um meio sem água de coco e incubado na luz, o explante está coberto pelo calo no qual se observa um fragmento vermelho (produção de pigmento?) e um fragmento esverdeado (atividade fotossintética?).

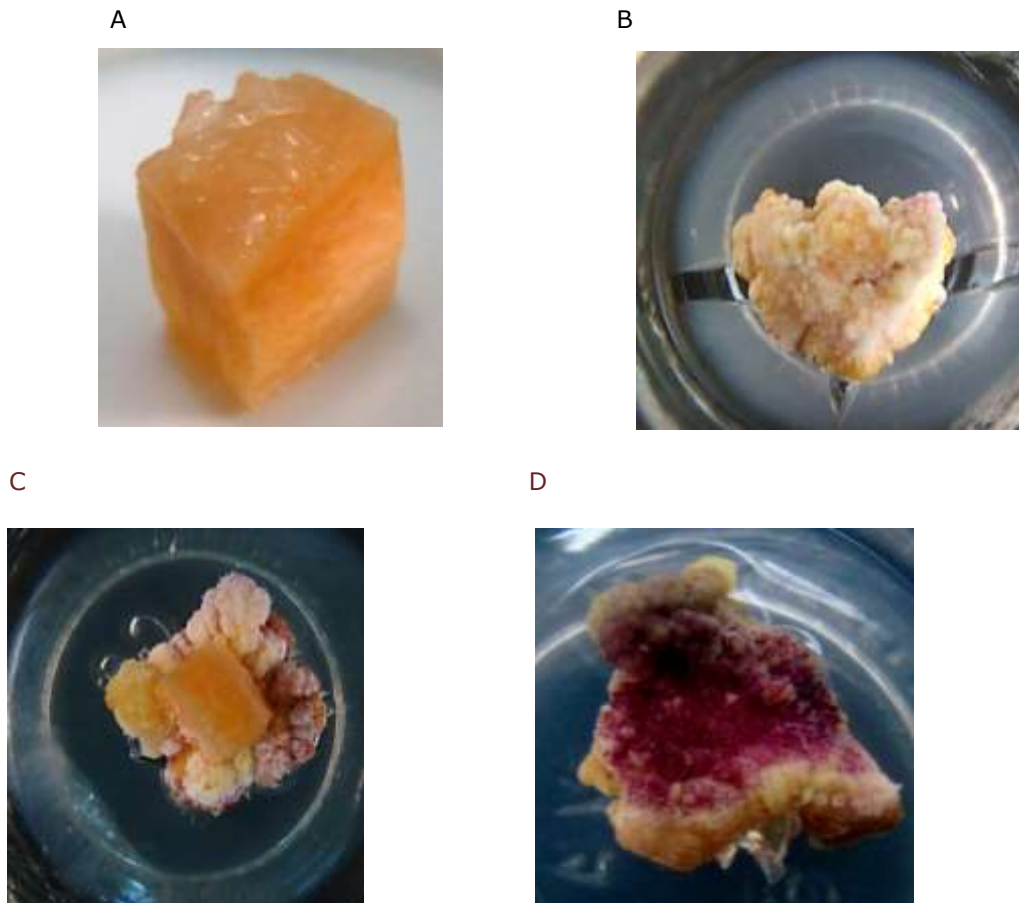


Figura 3. Calo de batata doce (*Ipomoea batatas*)

