

## MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *STEVIA REBAUDIANA* (BERTONI) BERTONI

Samuel Garcia Mello Dyna (PIBIC/FA/UEM), Sandra Aparecida de Oliveira Collet (Orientadora). E-mail: saocollet@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/ Genética Vegetal.**

**Palavras-chave:** Desinfecção; Stevia; Micropropagação.

### RESUMO

No presente estudo foram realizados diferentes métodos de desinfecção de plantas de *S. rebaudiana* para a micropropagação *in vitro*, com o objetivo de aprimorar o cultivo de stevias *in vitro* visando a extração seus metabólitos posteriormente. O uso de plantas cultivadas em ambiente fechado como fonte de explantes e os métodos de desinfecção menos agressivos permitiram resultados satisfatórios para a micropropagação desta espécie. As plantas micropropagadas *in vitro* estão sendo mantidas em meio de cultura MS com ½ da concentração original de sais, 15% de sacarose e 15% de água de côco e serão utilizadas para a extração de metabólitos de interesse industrial.

### INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni é uma espécie vegetal mundialmente conhecida pela produção de glicosídeos de esteviol, um adoçante natural não calórico obtido a partir de suas folhas (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que as raízes de *S. rebaudiana* são fontes promissoras para obtenção de frutanos, e a extração destes traz inovações e grande interesse ao setor industrial (LOPES, *et al.*, 2017), uma vez que esse polissacarídeo tem inúmeras aplicações importantes e alto interesse comercial, principalmente em formulações que trazem benefícios à saúde. A micropropagação *in vitro* pode ser uma metodologia biotecnológica para solucionar os problemas, e alcançar maior rendimento dos compostos de interesse industrial, além de conservar esta espécie na natureza. A técnica geralmente envolve o desenvolvimento *in vitro* de brotos a partir de gemas, em condições controladas de cultivo. Além da produção de mudas

em grande escala, em qualquer época do ano e com economia de tempo e espaço, as principais vantagens da micropropagação incluem a uniformidade no desenvolvimento das mudas e a obtenção de plantas com características genéticas idênticas à matriz e sadias, evitando assim a disseminação de pragas e doenças (EMBRAPA, 2021). O objetivo deste projeto foi otimizar as condições para a micropropagação de plantas sadias e completas de *S. rebaudiana* (Bertoni) Bertoni com o intuito de produção e manutenção destas para a extração dos compostos de interesse industrial no LABIPROS (Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos da UEM).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Desinfecção das plantas*

As vinte mudas de *S. rebaudiana* vindas da empresa *SteviaSoul*, foram mantidas em vasos com terra em ambiente aberto protegido com tela sombrite. O material vegetal destas plantas foi utilizado nos 3 primeiros experimentos de desinfecção. No experimento 1, as plantas foram pulverizadas com 100mL da solução contendo 1% de fungicida *cercobin* e 500 mg de azitromicina a cada 24h por 5 dias. Os segmentos nodais coletados foram colocados em água estéril com 1% de Polivinilpirrolidona (PVP) e levados ao laboratório. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram colocados em 3 diferentes concentrações de hipoclorito de sódio a 2% (puro e diluídos a 50% e 25%) por 15 minutos com leve agitação. Depois foram lavados 5 vezes em água estéril por 10 minutos cada. Após as etapas de desinfecção, os explantes foram inoculados em meios MS 1/3. No experimento 2, os segmentos nodais foram coletados e lavados em água corrente por 5 minutos, banhados com álcool 70% por 1 minuto, banhados com *lysoform* por 1 minuto e enxaguadas com água corrente 3 vezes por 1 minuto cada. E levados em água filtrada gelada para o laboratório, em câmara de fluxo laminar foram transferidos para uma solução com 50% de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e enxaguados com água estéril por 2 vezes por 10 minutos cada. Em seguida foram banhados com uma solução de 0,1% de  $\text{CuSO}_4$  por 10 minutos e enxaguadas 2 vezes com água estéril. Os segmentos nodais foram inoculados em meio MS 1/3. No experimento 3, os segmentos nodais coletados foram lavados em água corrente por 5 minutos, banhados com álcool 70% por 1 minuto, banhados com *lysoform* por 1 minuto e lavadas em água corrente 3 vezes por 1 minuto cada e levados ao laboratório em água filtrada gelada. Na câmara de fluxo laminar foram colocados em solução com 50% de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos e enxaguados 2 vezes com água estéril. Em seguida banhados com a solução de 0,1% de  $\text{CuSO}_4$  por 10

minutos e enxaguados 2 vezes com água estéril. Após, os explantes foram expostos a 30 segundos na luz UV e inoculados em meios MS 1/3 contendo o fungicida *cercobin* nas concentrações 1% e 2%. No experimento 4, os segmentos nodais foram coletados de plantas de cultura hidropônica mantida dentro do LABIPROS. Este material vegetal foi levado até o nosso laboratório em meio de cultivo hidropônico, foram lavados em água corrente por 5 minutos, banhados em água estéril com 3 gotas de detergente comercial por 1 minuto, banhados com álcool 70% por 1 minuto. Em câmara de fluxo laminar foram transferidos para a solução de 50% de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos, em seguida enxaguadas com água estéril 2 vezes e banhados com  $\text{CuSO}_4$  0,1% por 10 minutos, enxaguadas duas vezes com água estéril. Os explantes foram inoculados em meio MS 1/3 contendo 1% e 2% de fungicida *cercobin*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 7 a 10 dias de cultivo *in vitro*, os explantes foram avaliados. Do experimento 1, todos os explantes tratados com hipoclorito puro morreram oxidados, com 25% de hipoclorito apresentaram contaminação por fungos e bactérias, e metade dos explantes tratados com 50% de hipoclorito foram descontaminados e sobreviveram, os outros apresentaram contaminação por fungos e bactérias. Do experimento 2, em uma avaliação inicial 70% dos explantes pareciam descontaminados e saudáveis, mais a maioria deles oxidou depois de 20 dias de cultivo. Do experimento 3, 70% dos explantes inoculados no meio com 2% do fungicida desenvolveram sem contaminação, e 60% dos explantes inoculados no meio com 1% do fungicida desenvolveram sem contaminação. Mas com o passar do tempo a maioria das plantas cultivadas nestes meios morreram. Do experimento 4, 80% dos explantes inoculados em meio com fungicida não contaminaram, mas com mais o passar do tempo muitas plantas morreram. É provável que os explantes dos experimentos 3 e 4 cultivadas nos meios com o fungicida *cercobin*, tenham morrido por efeito deste composto, que se tornou tóxico para as plantas, prejudicando o desenvolvimento delas. A etapa de desinfecção das plantas é considerada difícil também para outras espécies vegetais cultivadas *in vitro*. Na micropropagação de plantas é frequente a inoculação de sementes estéreis para produzir plântulas estéreis *in vitro* e estas por sua vez serem micropropagadas. O uso de sementes é uma boa opção, pois são de fácil desinfecção, por serem mais resistentes aos agentes germicidas. Como não tivemos acesso as sementes de *Stevia*, investimos nossos esforços na desinfecção de plantas. As plantas desenvolvidas de explantes desinfectados foram cultivadas por cerca de 3 meses em meio MS 1/3 de sais e 15% de sacarose. Depois deste período e atualmente elas estão sendo repicadas e

transferidas para um meio MS com  $\frac{1}{2}$  da concentração original de sais, 15% de sacarose e 15% de água de côco. Nesta condição de cultivo, 57 plantas micropropagadas de *S. rebaudiana* estão vigorosas e crescendo rapidamente de forma que a cada 1 meses precisam ser repicadas e transferidas para novo meio.

## CONCLUSÕES

A desinfecção é uma etapa difícil, as plantas coletadas do campo apresentaram grande contaminação. O uso de agentes germicidas agressivos em altas concentrações e tempos de ação maiores foram eficientes no controle dos microrganismos, mas acabaram matando as plantas de *S. rebaudiana*. O uso das plantas cultivadas em ambiente fechado permitiu que métodos menos agressivos fossem eficientes na desinfecção.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a UEM e aos laboratórios de Biotecnologia Vegetal e LABIPROS, a SteviaSoul e a Fundação Araucária.

## REFERÊNCIAS

EMBRAPA. Produção de mudas micropropagadas de bananeira. Brasília, DF: EMBRAPA, 2012.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, v. 132, n. 3, p. 1121-1132, 2012.

LOPES, S. M. S.; KRAUSOVÁ, G.; CARNEIRO, J. W. P.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of Stevia rebaudiana Bertoni. *Food Chemistry*, v. 225, p. 154-161, 2017.