

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ALINE ARAÚJO MANOEL

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO UTILIZANDO MEIOS DE
CULTURA PARA VISUALIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RAÍZES**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

ALINE ARAÚJO MANOEL

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO UTILIZANDO MEIOS DE
CULTURA PARA VISUALIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RAÍZES**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências para a obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo. Modalidade:
trabalho científico.**

Orientador: Edson Marcio Mattiello

Coorientadores: Wedisson Oliveira Santos

Gustavo Nogueira G. P. Rosa

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

ALINE ARAÚJO MANOEL

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO UTILIZANDO MEIOS DE
CULTURA PARA VISUALIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RAÍZES**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de Viçosa
como parte das exigências para a obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo. Modalidade:
trabalho científico.**

APROVADO: 08 DE DEZEMBRO DE 2017

**Prof. Edson Marcio Mattiello
(Orientador)
(UFV)**

“É preciso encontrar as coisas certas da vida para que tenha o sentido que deseja. Assim, a escolha de uma profissão também é a arte de um encontro, porque uma vida só adquire vida quando a gente empresta nossa vida para o resto da vida.”

Vinícius de Moraes

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o desenvolvimento de plântulas de soja e milho utilizando diferentes tipos de recipientes, meios de cultura, com e sem supressão de nutrientes. Como recipientes, utilizaram-se placas de Petri, tubos de vidro e potes plásticos. Já como meios de cultura, utilizaram-se o BDA e ágar-ágar comerciais, com e sem a solução nutritiva B&G. Percebeu-se que é possível cultivar plantas de milho ou soja nos meios de cultura BDA ou ágar-ágar, entretanto o meio ágar-ágar é mais indicado pois promoveu melhor desenvolvimento das plantas, e também possibilitou melhor observação do crescimento e arquitetura do sistema radicular.

Palavras-chave: ágar-ágar, BDA, arquitetura de raízes.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the development of soybean and millet seedlings using different types of containers, culture media, without and with nutrient suppression. As containers, Petri dishes, glass tubes and plastic pots were used. As a means of culture, commercial BDA and agar-agar were used, with and without the B & G nutrient solution. It was noticed that it is possible to grow millet or soybean plants in the BDA or agar agar medium, but the agar medium is more indicated because it promoted a better development of the plants and also allowed a better observation of the growth and architecture of the root system.

Key words: agar-agar, BDA, root architecture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
<i>2.1. MEIO DE CULTURA BDA.....</i>	<i>9</i>
<i>2.2. MEIO DE CULTURA ÁGAR-ÁGAR.....</i>	<i>11</i>
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS	18

1. INTRODUÇÃO

Meios de cultura são tradicionalmente utilizados em diferentes áreas de estudo, como a fitopatologia e microbiologia para promover o crescimento microrganismos. Existem diferentes tipos de meio de cultura específicos para isolar ou crescer determinadas espécies de microrganismos. Também podem ser utilizados para transporte, conservação, provas de identificação ou para teste de sensibilidade a antimicrobianos (ANVISA, 2004).

Para a fabricação de alguns meios de cultura (meio chocolate, Thayer-martin chocolate, Salmonella-shigella, BDA, ágar-ágar entre outros) são utilizados agentes solidificantes, sendo o ágar o mais utilizado. O ágar nutriente também é utilizado como meio para cultivo preliminar de amostras submetidas à exames bacteriológicos e isolamento de organismos para culturas puras, sendo seu uso mais frequente para a conservação e manutenção de culturas em temperatura ambiente, além de ser simples, barata, fácil e rápida a sua preparação (ANVISA, 2004). O ágar também pode ser empregado como meio para germinação e crescimento de plantas. A composição química dos meios de cultura deve contemplar as demandas nutricionais de microrganismos ou plantas (Pizetta et al., 2006).

Os sistemas radiciais da planta realizam muitas funções adaptativas essenciais, incluindo a absorção de água e nutrientes, ancoragem ao solo e o estabelecimento de interações bióticas na rizosfera. Mudanças na arquitetura do sistema radicular podem afetar a capacidade das plantas de absorver nutrientes e água (López-Bucio, Cruz-Ramírez, & Herrera-Estrella, 2003) e possibilitar a adaptação das plantas à ambientes pobres em nutrientes.

O desenvolvimento do sistema radicular é geralmente altamente assimétrico e reflete a capacidade das raízes para ajustar seu crescimento e desenvolvimento a fatores ambientais (López-Bucio, Cruz-Ramírez, & Herrera-Estrella, 2003 apud Robinson, 1994; Forde & Lorenzo, 2001).

No trabalho de Pacheco-Villalobos e Hardtke (2009) pôde-se observar a diferença de crescimento de raízes de plantas utilizando placas MS-ágar e em um tubo contendo meio-phytagel, e as sementes foram germinadas dentro do tubo e das placas. Após a germinação, pôde-se observar toda a arquitetura da planta, formação e distribuição de raízes principais e secundárias.

O desenvolvimento de protocolos específicos para a germinação de sementes e visualização do desenvolvimento radicular de diferentes espécies é essencial no suporte

metodológico de pesquisas em muitas áreas de estudo, como para fertilizantes e estimuladores de crescimento.

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o desenvolvimento de plântulas de soja (*Glycine max*) e milho (*Pennisetum glaucum*) utilizando diferentes tipos de recipientes, meios de cultura sem e com supressão de nutrientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MEIO DE CULTURA BDA

Inicialmente, testou-se diferentes concentrações (40, 50 e 60 g/l) do meio de cultura BDA comercial (potato glucose agar), com e sem a solução nutritiva B&G (Alvarez V., 2007). Por apresentar média dureza, possibilitando melhor crescimento radicular, considerou-se a concentração 50 g/l, como a melhor.

A solução nutritiva B&G (Alvarez V., 2007) é uma solução composta por macro e micronutrientes vegetais, conforme segue: Sulfato de Ferro III (9,256 g/kg); EDTA (12,895 g/kg); Molibdato de Amônio (0,024 g/kg); Ácido Bórico (3,850 g/kg); Sulfato de Níquel (0,425 g/kg); Sulfato de Manganês (3,569 g/kg); Sulfato de Zinco (2,855 g/kg); Sulfato de Cobre (0,126 g/kg); Ureia (73,890 g/kg); MAP Purificado (126 g/kg); Nitrato de Potássio (200 g/kg); Cloreto de Potássio (303,510 g/kg); Sulfato de Potássio (10,950 g/kg); Sulfato de Magnésio (90,650 g/kg), e Nitrato de Cálcio (262 g/kg).

Para o ensaio, omitiu-se o P na composição do meio, tendo em vista que o protocolo em desenvolvimento objetiva estudos com fertilizantes fosfatados.

Na Tabela 1 estão descritos os teores totais de nutrientes do meio, que foi preparado misturando-se 40 g de sacarose, 4,34 g da mistura das fontes (omitindo a fonte de P, MAP Purificado) e posteriormente diluído em 10 L de água deionizada. O meio foi autoclavado a 120 °C, tratado com Derosal (50 mg/l) e com o antibiótico Sulfato de Estreptomicina (25 ml/l) para evitar proliferação de microrganismos.

Tabela 1: Teores totais de nutrientes contidos na solução nutritiva utilizada no ensaio

N	P	S	K	Ca	Mg	Cl	Mo	B
-----g/kg-----								
93,932	-	13,424	175,331	41,92	8,213	91,58	0,012	0,655
Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	Na			
-----g/kg-----								
1,759	0,928	0,571	0,063	0,081	1,56			

No ensaio, utilizaram-se placas de Petri descartáveis esterilizadas, com diâmetro de 90 mm e altura de 15 mm. As sementes de soja foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio (40 % v/v, diluído em água deionizada), de álcool (70 % v/v, diluído em água deionizada) e lavadas com água deionizada para retirar o excesso das soluções. A montagem nas placas foi feita em câmara de fluxo, esterilizando-se todo o material utilizado com álcool 70 %, para evitar contaminações, no Laboratório Bionema, no BIOAGRO. A condução do experimento foi realizado em câmara de crescimento no Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) a 25 °C, fotoperíodo de 12 h.

As sementes foram dispostas na placa de Petri, como mostrado na Figura 1A, posicionando-se duas sementes na superfície do meio, em paralelo em cada placa com aproximadamente 30 ml de meio de cultura. Após a germinação das sementes de soja, as placas foram cobertas com papel alumínio (Figura 1B) para evitar a entrada de luz, que poderia induzir ao fotoblastismo negativo, afetando negativamente o crescimento radicular. Foram retiradas as tampas das placas de Petri para possibilitar o crescimento livre das plantas, após 11 d da emergência, mas as placas foram mantidas cobertas com papel alumínio.



Figura 1. Disposição das sementes de soja em placa de Petri (A), e detalhe da cobertura com papel alumínio (B) visando bloquear a entrada de luz.

2.2. MEIO DE CULTURA ÁGAR-ÁGAR

Para a produção do meio ágar-ágar também se utilizou a solução nutritiva B&G. A concentração de ágar para esse meio foi de 20 g/l. O meio foi autoclavado a 120 °C. Foram utilizados tubos de ensaio de vidro e potes de 250 ml descartáveis, onde foram mantidos por 20 min em solução com água sanitária para desinfecção dos recipientes. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições.

Utilizaram-se sementes de soja e de milho, ambas tratadas com fungicida comercial Derosal, (princípio ativo carbendazim, na dose recomendada equivalente a 0,075 ml do produto para 0,075 kg de semente), sendo que durante a montagem considerou-se procedimentos assépticos para evitar contaminações microbianas, em câmara de fluxo, no Laboratório de Fungos da UFV. Em seguida, foram levados para a câmara de crescimento no LIE a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h (Figura 2).

Após a germinação das sementes, foram retiradas as tampas dos potes e o plástico filme que cobria os tubos, para que as plantas crescessem livremente e foi adicionado papel alumínio sobre os potes, individualmente, para evitar a entrada de luz. Adicionou-se água deionizada, para prevenir o secamento do meio.

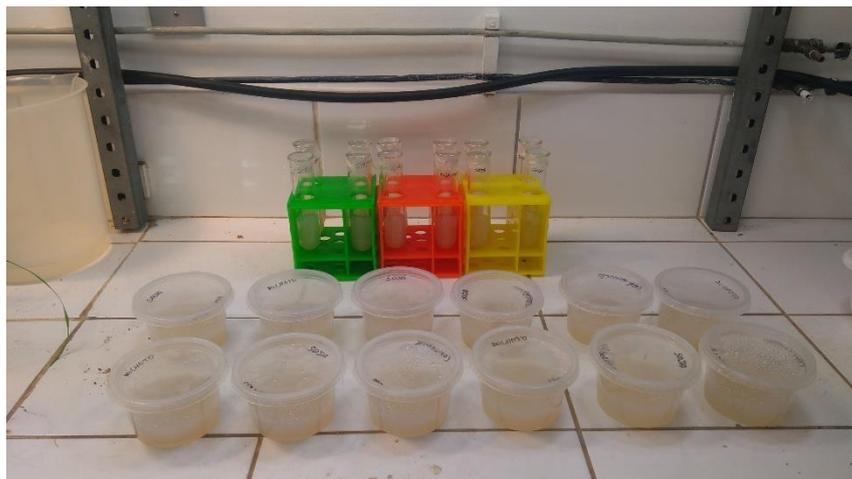


Figura 2. Visualização do ensaio em tubos e em potes.

Os ensaios com sementes de soja e de milho foram conduzidos por 21 e 8 d, respectivamente. O tempo menor para as sementes de milho se deve ao fato de as sementes não germinarem e com isso foi feito o plantio de sementes pré-germinadas. Logo após, mediu-se o comprimento da parte aérea, e massa de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Para tanto, as amostras foram secadas em estufa (70 °C) de ventilação forçada de ar até massa constante.

Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo os efeitos de recipientes e da omissão de nutrientes comparados por meio do teste F.

3. RESULTADOS

O ensaio com meio de cultura BDA foi contaminado por microrganismos após 4 d do destampamento. Sendo que aos 7 d apresentou-se contaminado, reduzindo o crescimento das plantas de soja (Figura 3). Também pôde-se observar o crescimento horizontal da planta de soja devido a placa de Petri limitar o seu crescimento vertical (Figura 3).



11 dias

11 dias

18 dias

18 dias

Figura 3. Desenvolvimento das plântulas de soja em meio de cultura tipo BDA, em nas placas de Petri.

Nos dois tratamentos houve problemas de contaminação e o impedimento do crescimento vertical das plantas.

No ensaio com ágar-ágar observou-se muito baixa contaminação do meio por microrganismos, sendo que tanto nos potes quanto nos tubos pôde-se observar o desenvolvimento radicular da planta.

Observa-se através da Figura 4 que houve facilidade de visualização do sistema radicular principal e secundário das plantas de soja, cultivadas em tubos de vidro. O meio apresentou-se pouco opaco, o que sugere a utilização de menores concentrações de ágar-ágar para este propósito.



Figura 4. Visualização de plântulas de soja crescidas em meio de cultura ágar-ágar, em tubos de vidro. Destaca-se a visualização da arquitetura do sistema radicular.

Pôde-se visualizar o sistema radicular das plantas de soja cultivadas em potes de plástico, no entanto a visualização da arquitetura radicular só foi possível no fundo do pote, devido a elevada opacidade do meio (Figura 5).

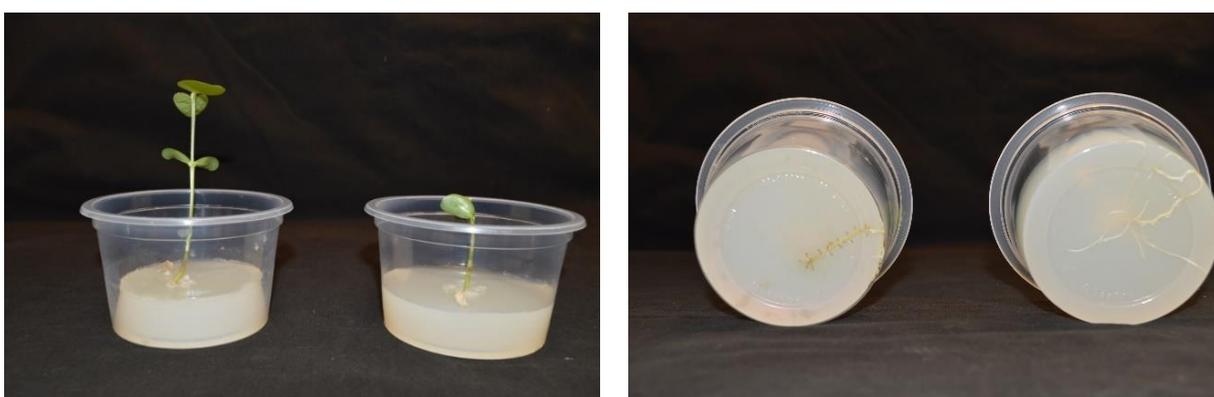


Figura 5. Visualização de plantas de soja com meio de cultura ágar-ágar em potes de plástico. Destaca-se a visualização da arquitetura do sistema radicular no fundo do pote.

Visualmente, percebeu-se que quando houve fornecimento de nutrientes (Figura 6A), aparentemente, o sistema radicular das plantas de soja se desenvolveram menos que quanto os nutrientes foram suprimidos (Figura 6B).



Figura 6. Plantas de soja que foram cultivadas em potes plásticos com meio de cultura ágar-ágar sem (B) e com solução nutritiva (A).

No meio de cultura ágar-ágar, tanto em potes de plástico como em tubos de vidro, houve desidratação e enovelamento radicular (Figura 7). Nos tubos, a perda de água do meio foi mais limitante para o desenvolvimento das plantas, devido ao menor volume de meio que intensificou o enovelamento radicular, dificultando a visualização da arquitetura. Já nos potes, mesmo havendo o ressecamento e início do enovelamento das raízes, não foi limitante devido a maior quantidade de meio e espaço para crescimento radicular.

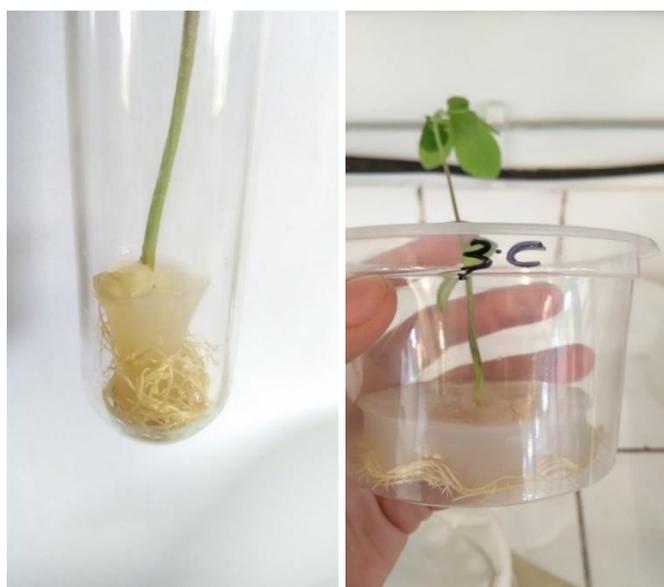


Figura 7. Detalhe do enovelamento do sistema radicular da soja e da diminuição do volume do meio de cultura ágar-ágar em tubos (a esquerda) e em potes (a direita), devido à perda de água.

Não houve efeito de recipiente e da supressão de nutrientes sobre a produção de matéria seca da parte aérea e da raiz da soja. Entretanto, curiosamente houve maior crescimento da parte aérea (CPA), quando houve omissão de nutrientes (Tabela 2). Para o milho (Tabela 3), devido à perda de unidades experimentais, não foi possível realizar a análise estatística dos dados.

Tabela 2: Efeito da presença de nutrientes no crescimento e produção de matéria seca da parte aérea e radicular de plantas de soja

Recipiente	MSPA		MSR		CPA	
	Sem SN	Com SN	Sem SN	Com SN	Sem SN	Com SN
	-----g planta ⁻¹ -----				-----cm-----	
Pote	0,148 aA*	0,102 aA	0,065 aA	0,024 aA	21.33 aA	13.54 aB
Tubo	0,150 aA	0,131 aA	0,042 aA	0,060 aA	23.67 aA	10.33 aB

*médias (n=3) seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste F

** MSPA (matéria seca da parte aérea); MSR (matéria seca radicular); CPA (comprimento da parte aérea).

Tabela 3: Efeito da presença de nutrientes no crescimento e produção de matéria seca da parte aérea e radicular de plantas de milho

Recipiente	MSPA		MSR		CPA	
	Sem SN	Com SN	Sem SN	Com SN	Sem SN	Com SN
	-----g planta ⁻¹ -----				-----cm-----	
Pote	0,0049	0,0074	0,0032	0,0055	7,5	17,5
Tubo	0,0063*	-	0,0026	0,0057*	8,5	20,0*

*número de repetições igual a 1. Demais valores foram obtidos de duas repetições.

** MSPA (matéria seca da parte aérea); MSR (matéria seca radicular); CPA (comprimento da parte aérea).

4. DISCUSSÃO

A contaminação microbiana do meio BDA deve-se ao fato de esse meio ser mais atrativo para diversos microrganismos por ser composto por batata, uma fonte de nutrientes, juntamente com a dextrose (ANVISA, 2004). Já o meio de cultura ágar-ágar contém carboidrato estrutural oriundo da parede celular de algas, sendo uma complexa mistura de polissacarídeos (Agargel, 2017), tornando o menos nutritivo, portanto menos atrativo para o crescimento microbiano.

As placas de Petri limitaram o crescimento das plantas, devido a pequena altura, não possibilitando o pleno crescimento vertical.

A coloração esbranquiçada no meio ágar-ágar facilitou a visualização das raízes. Entretanto, poderia ser menos opaca, utilizando-se menor concentração do meio, além de possibilitar que ficasse mais gelatinoso, facilitando a retirada do sistema radicular sem danos. O baixo nível (aproximadamente 5 cm de altura) de ágar-ágar no tubo fez com que as raízes ficassem enoveladas, o ideal seria uma altura maior para que houvesse melhor desenvolvimento do sistema radicular.

Para a condução de ensaio com meio de cultura ágar-ágar com plantas, é interessante a utilização de recipientes que possuem diâmetro e altura maiores, para possibilitar o crescimento das plantas por mais tempo, sem entrar em contato com o ambiente, e diminuindo a possibilidade de contaminação ou desidratação do meio.

As plantas que foram conduzidas sem solução nutritiva em meio de cultura ágar-ágar apresentaram maior crescimento radicular, havendo o aprofundamento do sistema radicular onde é possível porque as raízes são flexíveis, lubrificadas e podem alterar a direção para ultrapassar obstáculos, como agregados ou estruturas mais adensadas (Sediyama, Silva & Borém, 2015 apud Vepraskas, 1994), explorando todo o meio, utilizando sua reserva e a água contida no meio para crescer e desenvolver. Assim, o maior crescimento da parte aérea, no mesmo meio sem solução nutritiva, ocorreu o estiolamento das plantas de soja, em fase de emergência.

Recomenda-se o uso de sementes pré-germinadas, tendo em vista que os meios de cultura não propiciam condições ideais para a germinação das sementes, como arejamento e suprimento de água.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que é possível cultivar plantas de milho e soja em meio de cultura BDA e ágar-ágar. Objetivando visualizar a morfologia dos sistemas radiculares, o meio ágar-ágar é o mais indicado, não havendo necessidade do uso de solução nutritiva até 21 d de crescimento.

6. REFERÊNCIAS

- Agargel 2017. Disponível em <<http://www.agargel.com.br/agar-tec.html>>. Acessado em: 16 de novembro de 2017.
- ANVISA (2004). Descrição dos meios de cultura empregados em exames microbiológicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf>. Acessado em: 02 de novembro de 2017.
- Forde, B., & Lorenzo, H. (2001). The nutritional control of root development. *Plant Soil*, 51-68.
- Hochholdinger, F., & Zimmermann, R. (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Current Opinion in Plant Biology*, 70-74.
- Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H., & Leyser, H. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The plant Journal*, 751-760.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 280-287.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment*, 67-77.
- Sediyama, T., Silva, F. & Borém, A. (2015). Soja do plantio à colheita. Viçosa, MG: Editora UFV, p.30-31.
- Pacheco-Villalobos, D., & Hardtke, C. S. (23 de abril de 2012). Natural genetic variation of root system architecture from *Arabidopsis* to *Brachypodium*: towards adaptive value. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/367/1595/1552>>. Acessado em: 02 de novembro de 2017.

- Pizetta, M., Pierozzi, C. G., Pereira, G. V., Cruz, J. C., Christiane, Passador, M. M., & Furtado, E. L. (2006). Estudos de três meios de cultura axênicos. *Summa Phytopathologica*, 165-169.
- Robinson, D. (1994). The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol*, 635-674.
- Alvarez, V. V. H. (2007). B&G Flores - Nutrição Vegetal. Disponível em: <<http://www.begflores.com.br/>>. Acessado em 02 de novembro de 2017.