

Bruna Pires Jaeger (IC)¹; José Angelo Silveira Zuanazzi (PQ)¹

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90610-000, Brasil.

INTRODUÇÃO

O trevo-vermelho, *Trifolium pratense* L. (Figura 2 A) é uma espécie originária da Europa e Ásia, que foi naturalizada na América. Registros do século XII apontam seu uso para o tratamento de cataratas, atualmente, com muitas de suas propriedades reconhecidas, passou a ser utilizado no tratamento de gota e combate a tosse, bronquite e laringites.

É uma leguminosa rica em isoflavonas (substância que se assemelha ao estrogênio) e que pode impedir o desenvolvimento de células cancerígenas ou até mesmo tratar pacientes com certos tipos de câncer, como o endometrial. As isoflavonas mais comuns associadas com plantas são: daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A (Figura 1). Outra associação das isoflavonas encontradas em *T. pratense* é a prevenção de doenças cardiovasculares e osteoporose.

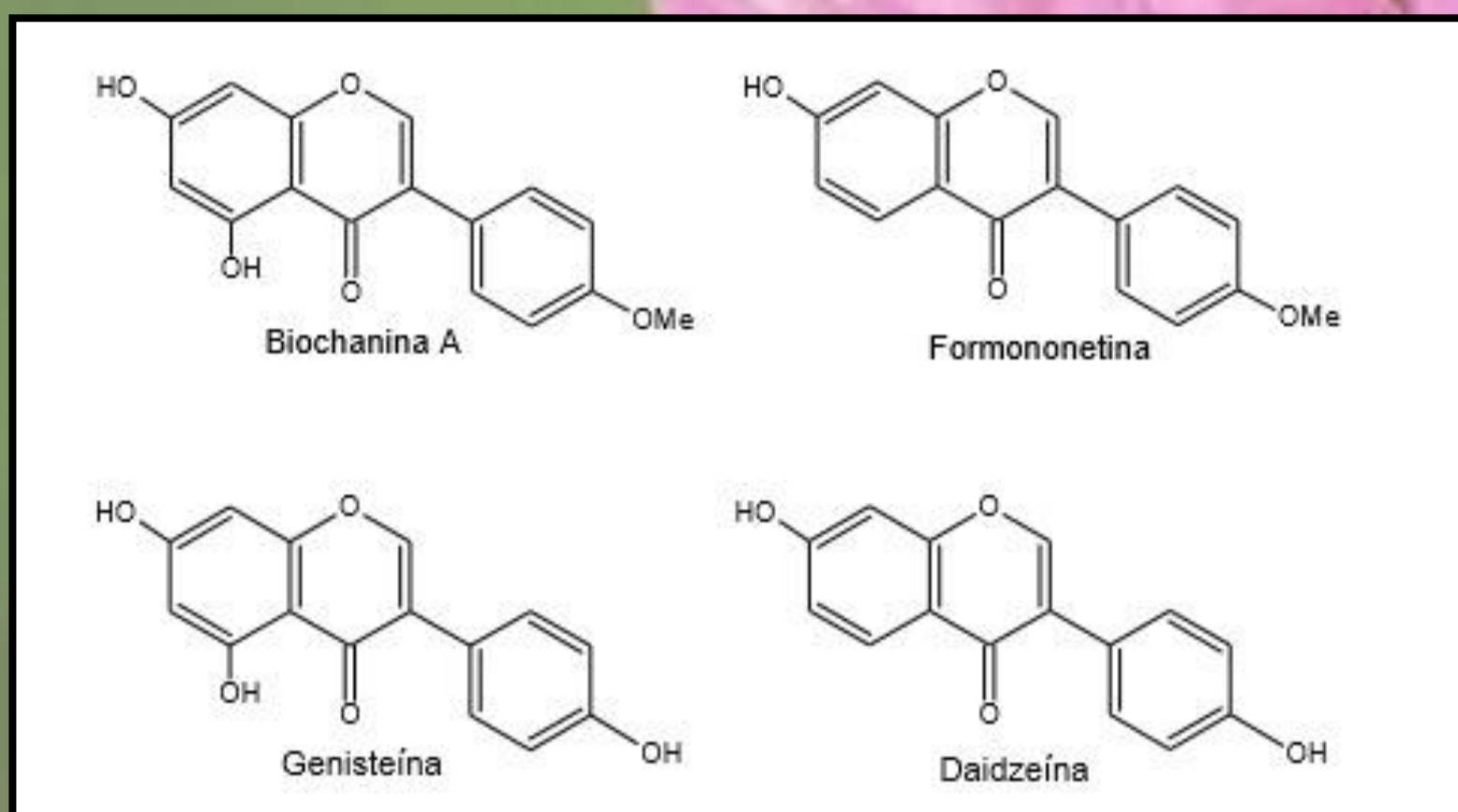


Figura 1: Estrutura química das isoflavonas mais comuns encontradas no *Trifolium pratense*.

Técnicas como a cultura de tecidos, vem sendo empregadas, visando a redução da coleta de espécies da flora nativa, possibilitando o cultivo de plantas em laboratório, com ambiente controlado e livre de micro-organismos e interferentes externos, possibilitando a manutenção de um microambiente propício para o desenvolvimento das plantas.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo para desinfestação da parte aérea da planta (pecíolo e folhas), visando a inoculação *in vitro* e estudos de micropropagação posteriores, assim como promover a germinação *in vitro* das sementes de *Trifolium pratense*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de *Trifolium pratense* foram doadas pelo professor Miguel Dalla'agnol, da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Após o recebimento das sementes, procedeu-se ao protocolo de desinfestação que iniciou-se com álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 11% + 2 gotas de tween para cada 100 mL de solução (5 min) sob agitação, e tríplice lavagem com água destilada e autoclavada, em fluxo laminar, para a remoção das soluções desinfestantes. Após o procedimento, as sementes ficaram secando em papel filtro esterilizado (30 min) e foram inoculadas. A desinfestação para as folhas e pecíolos, foi semelhante ao das sementes, sendo que o fator diferencial foi a diminuição da concentração de NaClO, para 2%, para não causar agressão ao tecido vegetal.

Tabela 1. Concentrações de reguladores de crescimento acrescidos ao meio MS para a inoculação de pecíolos e folhas de *Trifolium pratense*.

Meio	Regulador de crescimento	Concentração
MTV.1	Sem Regulador	
MTV.2	ANA	0,2 mg L ⁻¹
	AIA	0,2 mg L ⁻¹
MTV.3	BAP	1 mg L ⁻¹
MTV.6	BAP	1 mg L ⁻¹
	ANA	1 mg L ⁻¹
MTV.10	ANA	1 mg L ⁻¹
MTV.11	ANA	2,5 mg L ⁻¹
MTV.12	ANA	5 mg L ⁻¹
MTV.13	2,4-D	1 mg L ⁻¹
MTV.14	2,4-D	2 mg L ⁻¹
MTV.15	2,4-D	3 mg L ⁻¹

Os explantes das folhas e pecíolos foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 100 mg L⁻¹ de inositol, 0,7 % de ágar, 3% de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de tiamina, ácido nicotínico e piridoxina, pH 5,8 e acrescido de diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 1). As sementes foram inoculadas em MS, ½ MS e ¼ MS.

Os meios foram autoclavados por 20 min a 121°C. Após a inoculação, as sementes e os explantes foram levados para o escuro onde permaneceram por 15 dias e, após, foram transferidos para a luz (com fluxo de densidade de fótons de 40 μmol m⁻² s⁻¹), 25 °C ± 2 ° C, por mais 15 dias. Os meios foram avaliados quanto á germinação (sementes) e quanto à contaminação (pecíolos e folhas).

RESULTADOS

Após decorridos 30 dias, avaliou-se a germinação das sementes, (Tabela 2), os melhores resultados foram encontrados nos meios ½ MS e ¼ MS que apresentaram percentual de germinação de 83 e 70%, respectivamente, das sementes inoculadas (Figura 2 B).

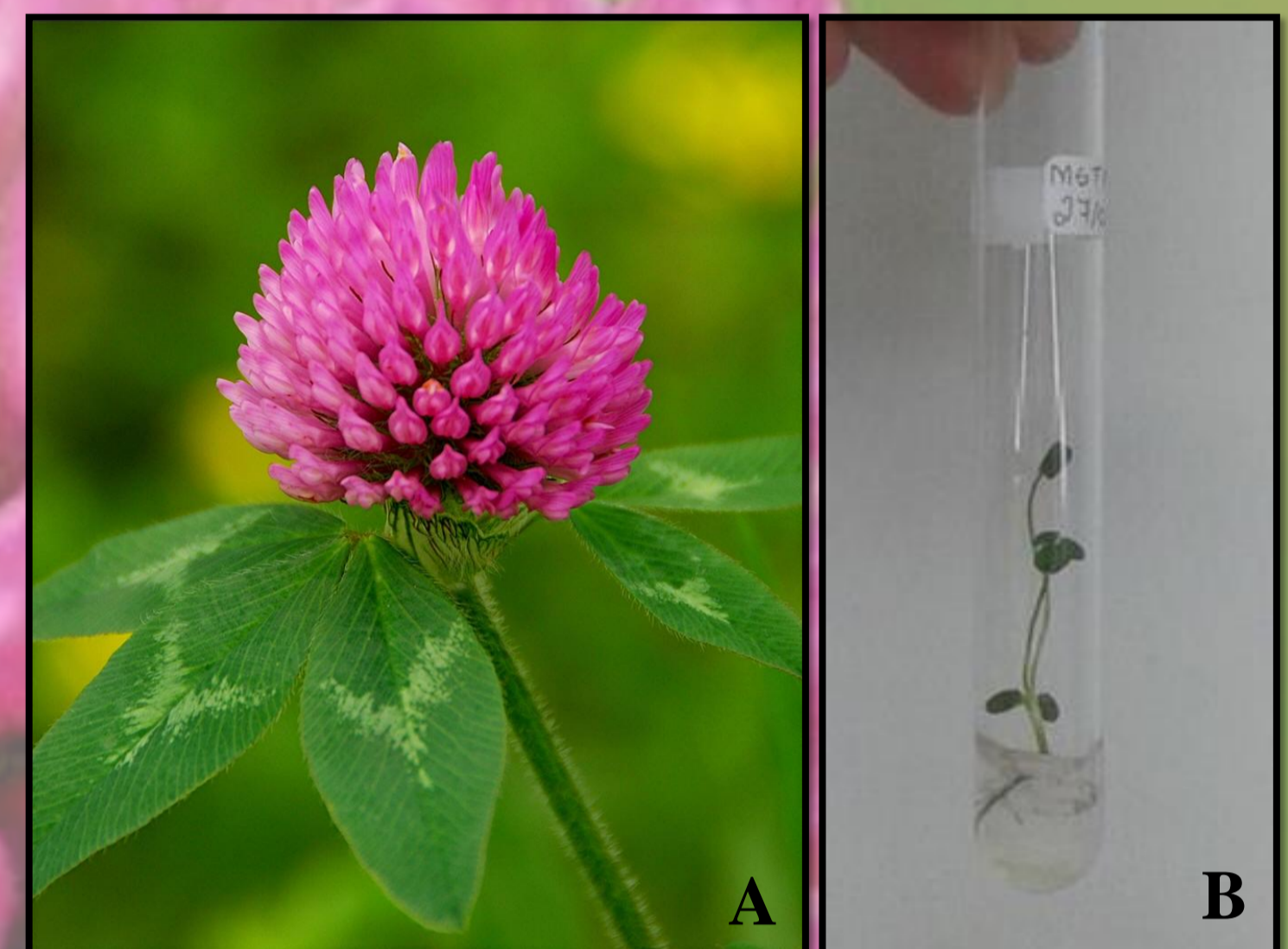


Figura 2: (A) Planta selvagem de *Trifolium pratense*. (B) Semente germinada de *T. pratense*, após 15 dias em cultivo.

Referente às folhas e pecíolos (Tabela 3), o meio onde se obteve maior contaminação dos pecíolos foi no meio MTV 12, porém, houve contaminação em todos os tratamentos, constatando que o método de desinfestação não foi eficaz para o órgão vegetal utilizado, apresentando contaminações fúngicas e bacterianas.

Para as folhas o maior percentual de contaminação foi de 13%, no meio MTV 13, com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D (Tabela 3).

Tabela 2. Percentual de germinação em sementes de *Trifolium pratense*.

Meio	% germinação
MS	42 B
1/2 MS	83 A
1/4 MS	70 A

Tabela 3. Percentual de contaminação de pecíolos e folhas de *Trifolium pratense*.

	Pecíolos	Folhas
MTV1	40,0	0,0
MTV2	40,0	0,0
MTV3	26,7	0,0
MTV6	33,3	0,0
MTV10	20,0	0,0
MTV11	26,7	0,0
MTV12	53,3	0,0
MTV13	40,0	13,3
MTV14	40,0	0,0
MTV15	26,7	6,7

CONCLUSÕES

De posse dos resultados determinou-se a maior eficiência em desinfestação com relação às folhas de *T. pratense* com o método utilizado, podendo este ser empregado para tal finalidade.

O meio 1/4 MS é um ótimo meio para germinação das sementes de *T. pratense* podendo ser utilizado para estudos posteriores.

A pesquisa com esta espécie encontra-se em andamento no nosso laboratório.

REFERÊNCIAS

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

AGRADECIMENTOS