

Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*

Gislene Côrrea Sousa^{1,2}, Pollyanna Lourenço Clemente^{1,2}, Valquiria Lorena Ramos Isaac^{1,2},
Syd Pereira Faria^{1,2} e Maria Rita de Cássia Campos³

Introdução

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de grande valor comercial. Desde o trabalho pioneiro de Warming [1], até levantamentos mais recentes [2], Orchidaceae tem sido apontada como uma das cinco famílias mais representativas da flora do Cerrado. Uma das formas de aumentar a produção de mudas com qualidade genética, e conservar espécies de orquídeas ameaçadas de extinção tem sido a micropropagação e a propagação *in vitro* [3,4]. A clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas tem permitido a compatibilização de demandas específicas do mercado.

Um dos maiores problemas da produção em escala comercial é a contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias durante as etapas de propagação *in vitro*. A contaminação estabelece-se no meio de cultura e/ou material vegetal competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento do explante, ocasionando, assim, sua perda.

Em princípio, existem quatro fontes de contaminação: a fonte de explante, meio nutritivo, o ambiente e o operador (habilidade). Outro fator relacionado à contaminação na propagação *in vitro* de orquídeas é o tamanho da semente (1-2mm de comprimento por 0,5 a 1,0mm de largura) [5]. O mais importante destes é a fonte de explante que deve ser desinfestada antes da inoculação *in vitro* a fim de eliminar microrganismos exógenos. O etanol é o desinfestante mais empregado [6]. Além da ação germicida, o etanol tem ação surfactante e facilita a ação de outros produtos sendo utilizado em concentrações de 70 a 80%. Dentre as várias substâncias germicidas a base de cloro, utilizadas para desinfestação de explantes, as mais comuns são o hipoclorito de sódio, encontrado em formulações comerciais de água sanitária ou o hipoclorito de cálcio encontrado na forma de pó em lojas comerciais [7]. Outras substâncias têm sido adicionadas ao meio de cultivo a exemplo de reguladores de crescimento, antibióticos, fungicidas, carvão ativo na tentativa de minimizar o problema.

Considerando a importância de estudos *in vitro* de espécies orquídeas, principalmente relacionados à conservação da espécie, este trabalho objetivou avaliar o

efeito da contaminação na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa*

Lindl. de ocorrência no Cerrado .

Material e métodos

A. Material vegetal

Foram usadas sementes das espécies *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa* obtidas a partir de cápsulas maduras coletadas na região de Morrinhos-GO. Antes de serem inoculadas no meio de cultivo essas sementes passaram por um processo de desinfestação [8].

B. Meio para inoculação de sementes

As sementes foram inoculadas no meio de germinação [9] acrescido de 2% de sacarose (g/L). Esse mesmo meio foi dividido em duas porções, em uma delas foi adicionado 0,1% de carvão ativado (g/L), pH 5,6. Cada meio foi distribuído em 42 tubos de ensaio de 150 x 18 mm. Após a inoculação, os tubos contendo as sementes foram conservados em ambiente escuro por sete dias e a seguir mantidos na luminosidade até a formação de plântulas. As condições de temperatura e luminosidade foram as do ambiente do laboratório de Biologia da Universidade Estadual de Goiás – Unidade Morrinhos.

C. Análise dos resultados

Cada espécie foi analisada separadamente e a cada 15 dias. Para isso foi quantificado o número de explantes contaminados por espécie e por tipo de meio. O experimento foi repetido duas vezes.

Resultados

Neste trabalho observou-se grande contaminação, principalmente por fungos e bactérias (Figura 1) com diferenças entre os meios de cultivos utilizados. A contaminação foi observada logo após a transferência do escuro para o ambiente de luminosidade. Verificou-se a ocorrência de maior frequência de contaminação entre a primeira e segunda avaliação e a partir daí houve considerável redução. Dentre a contaminação analisada 97% foi proveniente de contaminação por fungos e apenas 3% por bactéria.

Uma das causas de contaminação por fungos está relacionada a cuidados no ambiente. Mesmo com cuidados com assepsia, em biofábricas brasileiras já foram registradas porcentagens de contaminação superiores a 30% causadas tanto por fungos como por

1. Bolsista de Iniciação Científica e acadêmico do Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Goiás. Rua 14, 625, Morrinhos, GO, CEP 75650-000

2. Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Goiás. Rua 14, 625, Morrinhos, GO, CEP 75650-000

3. Professor do Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Goiás. Rua 14, 625, Morrinhos, GO, CEP 75650-000.

E-mail: mariarita_ueg@yahoo.com.br

bactérias [10]. O uso de fungicidas no meio de cultivo visando a redução da contaminação por fungos é usado por alguns autores [11]. Neste trabalho verificou-se que com algumas medidas de limpeza e até com a prática na manipulação houve considerável redução na contaminação por fungos.

Todos os genótipos responderam bem ao cultivo *in vitro*. De acordo com o que se observa na Figura 2 houve diferença na resposta entre os meios. Nota-se que na inoculação de novembro de 2005 (Figura 2A) a presença de carvão ativo no meio de cultivo foi significativa para a espécie *C. walkeriana*. Nesta espécie, em meio suplementado com carvão ativo a contaminação foi em torno de 20% contra 60% em meio sem carvão. O mesmo não foi observado para *S. crispa* nesta inoculação. No entanto, com a repetição do experimento (Figura 2B) observou-se que a presença de carvão ativo influenciou a resposta de ambas espécies. Além disso, mesmo as sementes que não contaminaram, em ambas espécies, no meio sem carvão não chegaram à conversão em plântula e os explantes apresentaram necrose. O mesmo não foi observado quando se utilizou carvão ativo no meio de cultivo.

Devem ser testadas novas espécies de orquídeas e outros agentes que assegurem uma melhor assepsia sem prejudicar o desenvolvimento dos explantes. Diante destes resultados pode-se inferir que o uso de carvão ativo no meio para as espécies estudadas contribuem não somente na redução de contaminação como na conversão em plântula.

Referências

- [1] WARMING, E. Et 1892. Bidrag til den biologiske Plantegeografi. Bianco Los Kgl. HofBotrykkeri, Kjobenvavn.
- [2] MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M. WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; REZENDE, A.V. FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E. 1998. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P. (Eds), *Cerrado: ambiente e flora*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina., Brasília. p. 289-556.
- [3] STANCATO, G.C. *et al* 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 7 (1): 25-33.
- [4] MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D. & DONATO, V.M.T.S. 2001. Propagação de orquídeas *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36 (10): 1319-1324, 2001.
- [5] PIERIK, R. L. M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. 1^a ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- [6] HIRATA, M.H. & MANCINI-FILHO, J. 2002. *Manual de biossegurança*. Barueri: Editora Manole. 496p.
- [7] GRATTAPALIA, D. & MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa – CNPH. p. 183-260.
- [8] CAMPOS, D.M. 1998. Orquídeas: Manual prático de cultura, Expressão e Cultura, 143p. Rio de Janeiro.
- [9] KNUDSON, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73 (1): 1-25.
- [10] OLIVEIRA, R. P. *et al*. 2000. Efeito da desinfestação e do uso de meios de indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. *Rev. Bras. Fruticult.*, Jaboticabal, 22 (1): 57-61.
- [11] COLOMBO, L.A.; FARIA, R.T.; CARVALHO, J.F.R.P.; ASSIS, A.M. & FONSECA, C.B. 2004. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. *Acta Scientiarum Agronomy*, 26(2): 253 – 258.

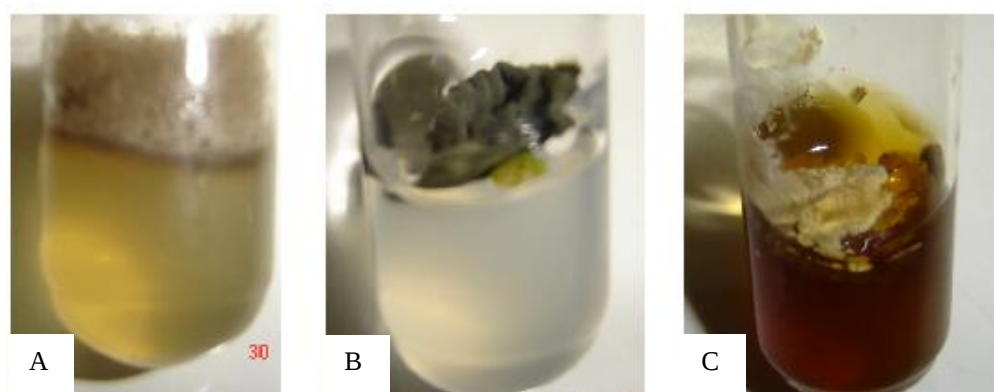


Figura 1. Tipos de contaminação observados quando da inoculação *in vitro* de sementes das espécies *Cattleya walkeriana* (A e B) e *Sciomburgkia crispa* (C).

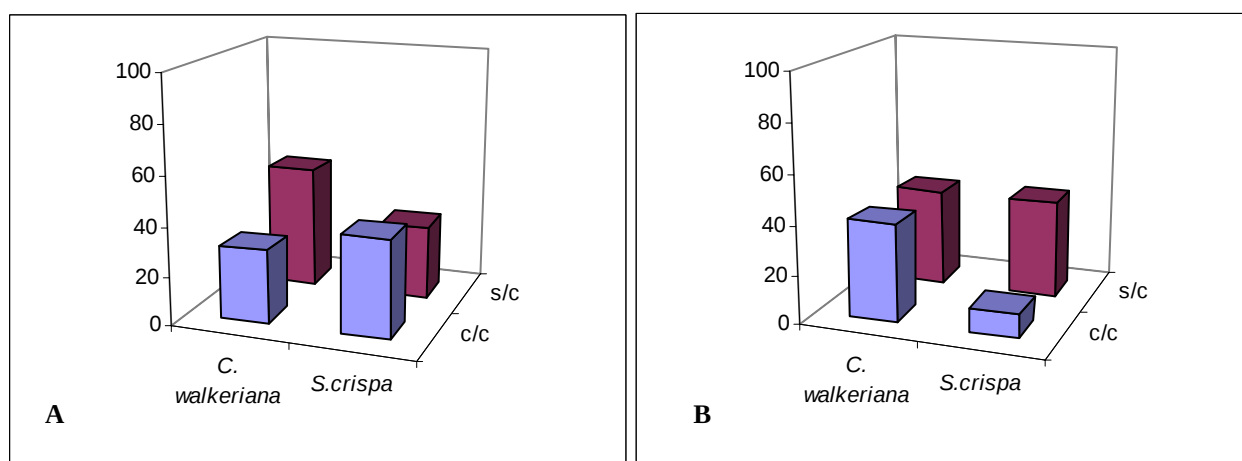


Figura 2. Porcentagem de contaminação na propagação *in vitro* de *C. walkeriana* e *S. crispa* em meios Knudson modificado (1922) suplementados ou não com carvão ativo. **A)** Média de 7 avaliações com inoculação em novembro de 2005 e **B)** Média de 7 avaliações com inoculação em janeiro de 2006.