

Protocolos de assepsia para cultivo *in vitro* de meristemas de orquídea

Asepsis protocol for *in vitro* cultivation of orchid meristems

RESUMO

Orquídeas são plantas altamente populares, que vem ganhando cada vez mais espaço no comércio mundial de plantas ornamentais. Apesar da sua diversidade, a elevada comercialização se tornou um problema para sua sobrevivência; enquanto a coleta da natureza é feita de forma excessiva e regular, seu desenvolvimento é um processo lento que acarreta em risco iminente de extinção. Como alternativa para se elevar a quantidade e velocidade de propagação de novas plantas, são aplicadas as técnicas de cultivo *in vitro*. Para que o cultivo tenha sucesso, deve-se garantir que o material inoculado esteja livre de qualquer contaminação microbiana, que pode ser evitada através de protocolos de assepsia eficientes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos de assepsia no cultivo *in vitro* de meristemas de orquídea. Três protocolos foram testados, utilizando-se diferentes agentes desinfetantes e em diferentes concentrações. Após assepsia, os meristemas foram inoculados em meio de cultivo MS e com sete dias de cultivo, foram analisados, para a presença ou não de contaminações. Os resultados obtidos não foram positivos, já que contaminações foram encontradas na maioria dos meristemas. Tais resultados indicam que a contaminação é endógena, não sendo possível eliminá-la com os protocolos aplicados.

PALAVRAS-CHAVE: Extinção. Contaminação. Microorganismos.

ABSTRACT

Orchids are highly popular plants that are gaining more and more and more space in the world trade in ornamental plants. Despite its diversity, high commercialization has become a problem for its survival; while nature's collection is excessive and regular, its development is a slow process that carries an imminent risk of extinction. As an alternative to increase the amount and speed of propagation of new plants, *in vitro* cultivation techniques are applied. For cultivation to be successful, it must be ensured that the inoculated material is free of any microbial contamination, which can be prevented by efficient aseptic protocols. Therefore, the objective of this work was to evaluate different aseptic protocols in the *in vitro* culture of orchid meristems. Three protocols were tested using different disinfectant agents and at different concentrations. After asepsis, meristems were inoculated in MS culture medium and after seven days of culture, they were analyzed for the presence or absence of contamination. The results obtained were not positive, since contamination was found in most meristems. These results indicate that the contamination is endogenous and cannot be eliminated with the applied protocols.

KEYWORDS: Extinction. Contamination. Microorganisms.

Gabriela Zanella
gabrielaazanella@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Betty Cristiane Kuhn
bettykuhn@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A comercialização de plantas ornamentais se tornou um dos mais promissores segmentos da agricultura brasileira, em decorrência da melhor qualidade de vida e bem-estar proporcionadas por esta classe de plantas (DONATO, 2014). Dentre a grande diversidade das plantas ornamentais, destacam-se as orquídeas, plantas fascinantes e populares perante aos consumidores, que vêm sendo cada vez mais valorizadas, por exibirem alta diversidade floral, de tamanho, cor e fragrância, além de seu elevado tempo de vida útil floral, que as tornam preferidas pela população (ZHANG, 2018).

Tais características contribuíram para a expansão da sua produção comercial, que atualmente se tornou uma parcela significativa do comércio mundial de flores. Por serem altamente valiosas para as indústrias florais, as orquídeas são frequentemente coletadas da natureza, tornando muitas espécies raras (ZHANG, 2018). Outro fator que contribui com o risco de extinção é o tempo elevado de desenvolvimento de novas plantas (SUZUKI et al., 2010), desta forma, se tornam essenciais as técnicas de cultivo *in vitro*, que possibilitam a obtenção de um número maior de plantas e com uma velocidade de propagação superior que os métodos tradicionais, ocasionando a recuperação das espécies em extinção (FRÁGUAS et al., 2003).

O cultivo *in vitro*, se baseia no cultivo de células e tecidos vegetais em recipientes fechados, com controle de temperatura, luminosidade e pH, sob condições de assepsia e utilizando meios de cultura artificiais. O controle de assepsia é um dos princípios básicos para o sucesso do cultivo *in vitro*, já que esta técnica proporciona um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, como fungos e bactérias (PEREIRA; CORREA; BOLIANI, 2011). As contaminações podem comprometer o estabelecimento do material vegetal *in vitro*, ocasionando perda completa do cultivo. Portanto, são necessários protocolos de assepsia capazes de eliminar ou pelo menos minimizar a contaminação do explante vegetal, para que assim, o cultivo *in vitro* possa proporcionar os resultados desejados (PEREIRA; CORREA; BOLIANI, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos de assepsia, no cultivo *in vitro* de meristemas de orquídea, para controle da contaminação microbiana.

METODOLOGIA

PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

Para os testes de assepsia, foi utilizado o meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em 300 mL de água, foram adicionados o meio MS, ágar e sacarose. O pH da solução foi ajustado para valores entre 5,7 e 5,8; em seguida o meio de cultura foi levado ao micro-ondas até atingir fervura, para proporcionar total diluição do ágar e homogeneização da solução. Após fervura, 3 mL de meio de cultivo foram transferidos para frascos de ampicilina, os quais foram fechados com papel alumínio, colocados dentro de sacos plásticos e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

PROTOCOLOS DE ASSEPSIA

Para estabelecimento do cultivo *in vitro*, utilizou-se como fonte de explante, meristemas da orquídea *Phalaenopsis*; estes meristemas estão posicionados nas hastes das plantas, que foram seccionadas e lavadas antes da esterilização. A assepsia destas hastes se deu por três protocolos. O protocolo 1, consistiu em três tratamentos com seis repetições cada e está apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Protocolo de assepsia 1

Tratamento 1.1	Tratamento 2.1	Tratamento 3.1
Cerconil (concentração original – 25 minutos)	Cerconil (metade da concentração – 25 minutos)	Cerconil (dobro da concentração – 25 minutos)
Hipoclorito de sódio 20% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 20% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 20% (5 minutos)
Álcool 70% (5 minutos)	Álcool 70% (5 minutos)	Álcool 70% (5 minutos)

Fonte: Autoria própria (2019)

Para o protocolo 2, as hastes já seccionadas e lavadas permaneceram por 25 minutos em solução de cerconil com o dobro da concentração original e 5 minutos em soluções de hipoclorito de sódio a 20% e álcool a 70%. Nesta assepsia, foram realizados três tratamentos com sete repetições; após imersão das hastes em álcool, os meristemas foram removidos para inoculação. A assepsia para os meristemas, está representada no Quadro 2.

Quadro 2 – Protocolo de assepsia 2.

Tratamento 1.2	Tratamento 2.2	Tratamento 3.2
Inoculação direta	Hipoclorito de Sódio 1% (2 minutos)	Hipoclorito de Sódio 1% (5 minutos)
-----	Álcool 70% (2 minutos)	Álcool 70% (5 minutos)

Fonte: Autoria própria (2019)

O protocolo 3, consistiu em seis tratamentos com quatro repetições. As hastes já seccionadas e lavadas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos, antes de serem levadas ao fluxo laminar, onde permaneceram por mais 5 minutos em soluções de hipoclorito de sódio a 20% e álcool a 70%. Em seguida, os meristemas de todas as hastes foram removidos e passaram por diferentes assepsias em cada um dos tratamentos. Neste protocolo foi aplicado um antibiótico diretamente no meio de cultivo, após inoculação dos meristemas. O protocolo 3 está representado no Quadro 3.

Quadro 3 – Protocolo de assepsia 3.

Tratamento 1.3	Tratamento 2.3	Tratamento 3.3	Tratamento 4.3	Tratamento 5.3	Tratamento 6.3
Hipoclorito de sódio 1% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 5% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 1% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 5% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 1% (5 minutos)	Hipoclorito de sódio 5% (5 minutos)
Álcool 70% (1 minuto)	Álcool 70% (1 minuto)	Álcool 70% (1 minuto)	Álcool 70% (1 minuto)	Álcool 70% (1 minuto)	Álcool 70% (1 minuto)
Sem antibiótico	Sem antibiótico	1 µL de antibiótico	1 µL de antibiótico	5 µL de antibiótico	5 µL de antibiótico

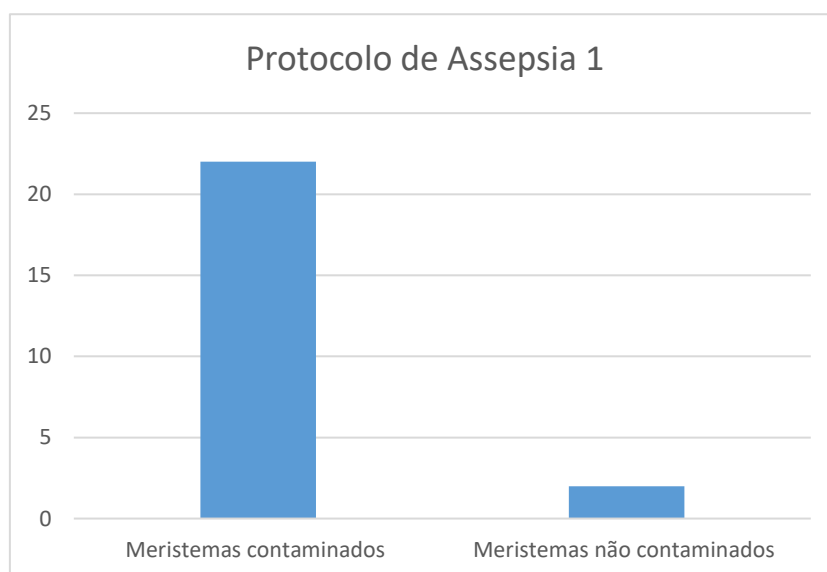
Fonte: Autoria própria (2019)

Após assepsia, todos os meristemas passaram por uma tríplice lavagem em água e foram inoculados em meio de cultivo. Ambas as etapas ocorreram no fluxo laminar, sendo que em cada frasco de ampicilina foi inoculado apenas um meristema. Os frascos de cultivo foram fechados com papel filme e mantidos em sala de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas claros, temperatura de 21°C +-2, e lâmpadas LED. Após 7 dias de inoculação, foi realizada a avaliação dos meristemas, para presença ou não de contaminações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do protocolo 1 são apresentados na Figura 1.

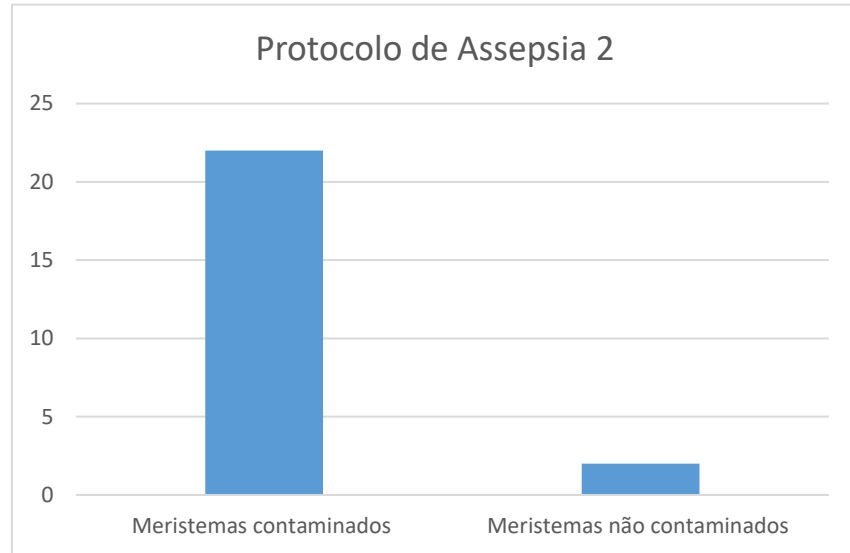
Figura 1 – Meristemas contaminados e não contaminados no protocolo de assepsia 1



Fonte: Autoria própria (2019)

Para o protocolo 2, os resultados estão representados na Figura 2.

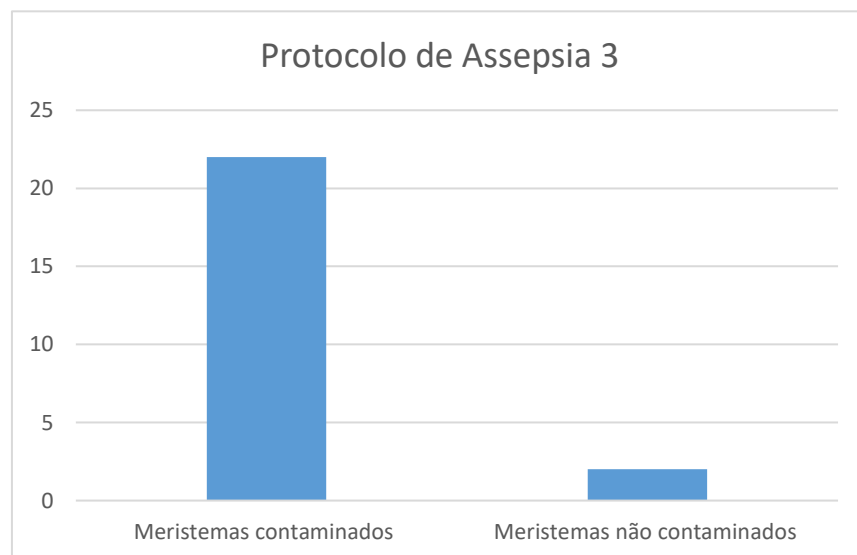
Figura 2 – Meristemas contaminados e não contaminados no protocolo de assepsia 2.



Fonte: Autoria própria (2019)

A Figura 3, ilustra os resultados obtidos no protocolo 3.

Figura 3 – Meristemas contaminados e não contaminados no protocolo de assepsia 3.



Fonte: Autoria própria (2019)

Como demonstrado nas figuras acima, os resultados obtidos não foram satisfatórios, já que em cada protocolo apenas um ou dois dos meristemas inoculados não apresentaram alguma contaminação. Os compostos utilizados para assepsia do material vegetal já se mostraram eficientes em outras situações, como no trabalho de Ledo et al. (2007), onde explantes de mangabeira foram esterilizados com detergente, álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 10%, com 100%

dos contaminantes eliminados. Neste trabalho, três diferentes abordagens foram testadas, abrangendo contaminações por fungos e bactérias, utilizando-se de diferentes concentrações de compostos assépticos e capazes de eliminar qualquer contaminação causada por microrganismos presentes exogenamente no meristema, desta forma, as contaminações obtidas indicam que os microrganismos presentes no material vegetal são de origem endógena, não sendo possível a sua eliminação com protocolos tradicionais de assepsia.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra a importância da assepsia nos cultivos *in vitro* e os desafios encontrados para se obter uma cultura livre de contaminantes. Os diferentes protocolos de assepsia avaliados indicam que a contaminação encontrada nos meristemas é endógena, não sendo possível eliminar os agentes contaminantes, como acontece no caso de contaminações exógenas. Desta forma, com os protocolos empregados, não foram obtidos resultados satisfatórios para as contaminações presentes nas orquídeas.

REFERÊNCIAS

- DONATO, V. **Mercado de plantas ornamentais e flores cresce mais de 8% no Brasil.** Disponível em: [http://g1.globo.com/jornal-
hoje/noticia/2014/02/mercado-de-plantas-ornamentais-e-flores-cresce-mais-de-
8-no-brasil.html](http://g1.globo.com/jornal-
hoje/noticia/2014/02/mercado-de-plantas-ornamentais-e-flores-cresce-mais-de-
8-no-brasil.html). Acesso em: 07 ago. 2019.
- FRÁGUAS, C.B. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, p.719-726, 2003. Disponível em: <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/2910/771>. Acesso em: 07 ago. 2019.
- PEREIRA, G. A.; CORRÊA, L. DE S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira “Grande Naine” em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. spe1, p. 222–226, 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-
29452011000500026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-
29452011000500026). Acesso em: 07 ago. 2019.
- SUZUKI, R.M. et al. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v.37, n.4, p.731–742, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v37n4/v37n4a04>. Acesso em: 07 ago. 2019.
- ZHANG, S. et al. Physiological diversity of orchids. **Plant Diversity**, v. 40, n. 4, p. 196–208, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468265918300556>. Acesso em: 07 ago. 2019.
- LÉDO, A. DA S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 989–993, 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-
70542007000400007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-
70542007000400007). Acesso em agosto de 2019.