

Técnicas assépticas para limpeza de bulbos de algumas ornamentais cultivadas *in vitro*¹

Mario Angelo Vidor

No cultivo de tecidos de explantes procedentes de bulbos, rizomas e estolões são, com freqüência, encontradas altas taxas de contaminação causadas por bactérias, fungos ou outros organismos (1). A desinfecção de materiais vegetais contaminados por microorganismos do solo é sempre difícil e aleatória. Para bulbos ornamentais, a saber, *Hyacinthus amethystina* (jacinto), *Tulipa gesneriana* (tulipa), *Iris hollandica* (íris) e *Narcissus hybrids* (narciso), como em todas as bulbosas em geral, um dos maiores obstáculos quando se pretende sua propagação através de técnicas de cultivo *in vitro* é eleger a metodologia adequada para assepsia dos bulbos.

Numerosas tentativas para diminuir a contaminação em bulbos de algumas cultivares de *Narcissus* 'Golden Harvest' foram realizadas (2). Depois de tratar os explantes com hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos, por 2 horas ou em dupla desinfecção, não se conseguiu reduzir a contaminação das escamas dos bulbos abaixo dos 40%. O tratamento dos bulbos com água quente a 54°C, por 1 a 3 horas, antes da utilização do hipoclorito de sódio, reduziu a contaminação a 5%, enquanto que a regeneração dos bulbos não foi afetada. Contudo, em um ensaio de assepsia com *Narcissus* cultivar Salomé e *Narcissus confusus* Pugaley (3), foi conseguida grande eficiência quando se trataram os bulbos com água a 54°C por 1 hora, mas este efeito positivo na assepsia se converteu em efeito negativo quanto à resposta organogênica, a tal ponto que só houve regeneração nos

bulbos não tratados.

Com a finalidade de estabelecer um procedimento de assepsia para a introdução em cultivo *in vitro* de jacinto, tulipa, íris e narciso, com especial ênfase a jacinto, se levou a cabo uma série de ensaios. Os trabalhos foram realizados em 1992, no laboratório de biotecnologia da Escola Técnica Superior de Engenheiros Agrônomos da Universidade Politécnica de Madri, Espanha.

Metodologias e discussões

Foram usadas cinco metodologias distintas de desinfecção de bulbos. Em todas elas, os bulbos foram armazenados previamente em câmara fria a 4°C, sendo que para os ensaios os bulbos foram partidos e foram descartadas as escamas mais externas e mais internas, fazendo-se uso das intermediárias (4). As partes divididas dos bulbos foram lavadas ligeiramente com sabão doméstico a 20% e logo enxaguadas em água corrente durante 60 minutos. O número de explantes usados por tratamento foi de 50, e a avaliação foi feita aos 75 dias de cultivo, sendo subcultivados a cada 25 dias, exceção feita ao ensaio com miconazol, no qual o número de explantes foi de 54 e a avaliação foi feita aos 60 dias com subcultivo aos 30 dias. Foram considerados nos resultados os explantes viáveis, não contaminados e vivos. O meio utilizado para cultivo foi o MS suplementado com 5,37 µM de ANA (ácido naftalenoacético) e 2,22 µM de BA (6-benzilaminopurina) (5).

Os métodos de assepsia ensaiados,

com os respectivos resultados e discussões, estão listados abaixo. As espécies ensaiadas foram *Hyacinthus amethystina* (jacinto), *Tulipa gesneriana* (tulipa), *Iris hollandica* (íris) e *Narcissus hybrids* (narciso).

Ensaio 1 - Assepsia de jacinto, tulipa, íris e narciso com álcool e água sanitária comercial - Fase 1

A assepsia dos bulbos constou das seguintes etapas:

a) manutenção dos bulbos por um período mínimo de quatro semanas em câmara fria a 4°C de temperatura e em escuridão;

b) divisão do bulbo, tirando as escamas externas e internas, o ápice e a base do bulbo, aproveitando as escamas intermediárias;

c) imersão destas escamas intermediárias em solução aquosa com detergente comercial de cozinha líquido (limpa louças) em proporção de 20%;

d) lavagem com água destilada por 60 minutos;

e) aplicação dos tratamentos da Tabela 1;

f) três lavagens sucessivas com água destilada estéril durante 5 minutos cada uma, para eliminar o resto da água sanitária comercial. As escamas permaneciam no último banho até sua utilização.

A análise dos dados da Figura 1 permite verificar que a concentração e tempo de imersão em álcool pouco afetou a assepsia dos bulbos. Para as quatro espécies estudadas, de maneira geral, os tratamentos mais eficazes fo-

1. Extraído da tese de doutorado do autor.

ram os denominados 4, 9, 10, 16, 21 e 22, independente da concentração e tempo de imersão em álcool e tempo de imersão em água sanitária, mas com uma concentração desta de 20%. Os métodos de assepsia permitiram obter em jacinto em torno de 45% de explantes viáveis; em narciso e íris, em torno de 32% de explantes viáveis, e em tulipa em torno de 12% de explantes viáveis, mas que não se regeneravam.

A eficiência na metodologia pode variar dependendo do material de partida. Resultados satisfatórios foram obtidos por inúmeros autores que utilizaram tempos e concentrações de álcool e água sanitária semelhantes aos empregados neste trabalho, conseguindo até 85% de bulbos desinfestados (4 e 6).

Com objetivo de melhorar os resultados obtidos neste ensaio, resolveu-se experimentar distintos tempos de imersão em água sanitária, como se pode ver no ensaio 2.

Ensaio 2. Assepsia de jacinto, tulipa, íris e narciso com álcool e água sanitária comercial - Fase 2

Com base nos resultados obtidos no ensaio anterior - fase 1 - e utilizando o mesmo procedimento dos passos a, b, c e d do mesmo ensaio, passou-se a testar o tempo de permanência das escamas em solução com água sanitária comercial. Banharam-se as escamas interme-

Tabela 1 - *Tratamentos assépticos com álcool e água sanitária comercial - Fase 1*

Tratamento	�lcool (% em volume)	Tempo em álcool (s)	Concentração de água sanitária (% em volume)	Tempo em água sanitária (min.)
1	85	30	10	15
2	85	30	10	25
3	85	30	20	15
4	85	30	20	25
5	85	30	40	15
6	85	30	40	25
7	85	120	10	15
8	85	120	10	25
9	85	120	20	15
10	85	120	20	25
11	85	120	40	15
12	85	120	40	25
13	50	30	10	15
14	50	30	10	25
15	50	30	20	15
16	50	30	20	25
17	50	30	40	15
18	50	30	40	25
19	50	120	10	15
20	50	120	10	25
21	50	120	20	15
22	50	120	20	25
23	50	120	40	15
24	50	120	40	25

diárias em álcool a 80% por 1 minuto; seguiu-se imersão em solução aquosa de água sanitária comercial a 20% mais algumas gotas de tween 20; foram tes-

tados cinco períodos de imersão em água sanitária comercial (Tabela 2). Depois disto, se procedeu como no ensaio anterior.

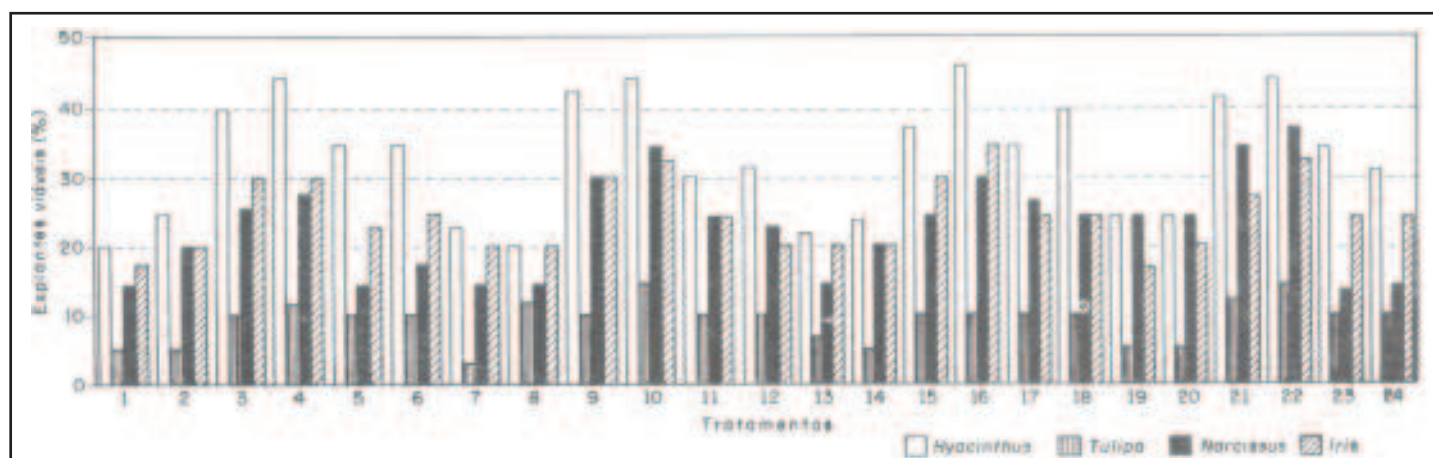


Figura 1 - *Percentagem de explantes de Hyacinthus amethystina, Tulipa gesneriana, Iris hollandica e Narcissus hybrids viáveis (não contaminados e vivos) aos 75 dias de cultivo. Número de explantes/tratamento = 50 (Ensaio 1)*

Tabela 2 - *Tratamentos assépticos com álcool e água sanitária comercial - Fase 2*

Tratamento	Álcool (% em volume)	Tempo em álcool (min.)	Concentração de água sanitária (% em volume)	Tempo em água sanitária (min.)
1	80	1	20	20
2	80	1	20	25
3	80	1	20	35
4	80	1	20	45
5	80	1	20	55

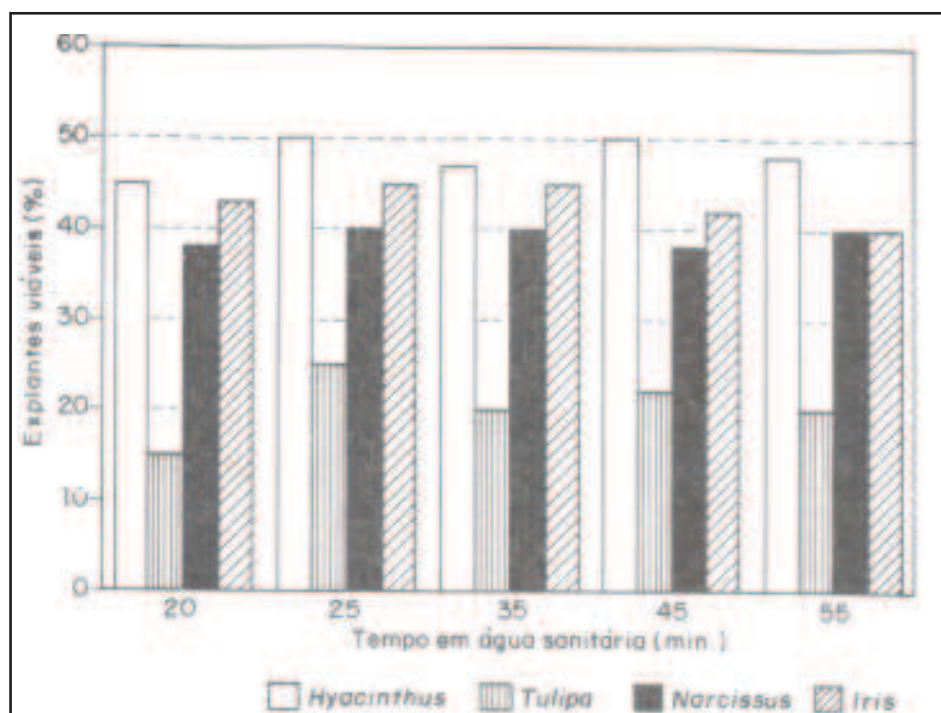


Figura 2 - *Porcentagem de explantes de Hyacinthus amethystina, Tulipa gesneriana, Iris hollandica e Narcissus hybrids viáveis (não contaminados e vivos) aos 75 dias de cultivo. Número de explantes/tratamento = 50 (Ensaio 2)*

Os resultados mostrados na Figura 2 foram muito semelhantes, sendo que na faixa dos 25 aos 45 minutos de imersão se obtiveram melhores resultados assépticos, de maneira geral, para as quatro espécies, mas sempre com baixa eficiência, chegando-se a um máximo de 50% dos bulbos não contaminados. Além disso, constatou-se que tempos de imersão superiores a 45 minutos influenciaram negativamente o vigor dos explantes, e que depois dos 60 dias os mesmos começaram a se necrosar, apresentando uma coloração

marrom-escuro, principalmente em tulipa e narciso.

Uma das razões que podem justificar a baixa sobrevivência dos explantes quando ao tempo de imersão em água sanitária (superior a 45 minutos) é o fato de que o tecido superficial pode ter excessiva infiltração da água sanitária, e isso pode inibir o desenvolvimento celular e reduzir a capacidade regenerativa (6). Em trabalho com íris foram conseguidos os mesmos níveis de regeneração, com tempos entre 5 e 60 minutos, quando eliminado o tecido

superficial do explante (6).

Ensaio 3 - Assepsia de jacinto, tulipa, íris e narciso com utilização de cloreto de mercúrio (HgCl)

Utilizou-se cloreto de mercúrio como agente desinfectante, tal como se descreve a seguir:

- manutenção dos passos a, b, c e d do ensaio 1;
- imersão em álcool a 80% por 1 minuto;
- imersão em solução aquosa com HgCl a 0,5% por 3 minutos;
- lavagem com água destilada estéril por 10 minutos para eliminar os restos de HgCl;
- imersão em solução aquosa de água sanitária comercial a 10% por 15 minutos;
- lavagem com água destilada estéril por 5 minutos;
- imersão em solução aquosa de água sanitária comercial a 20% por 5 minutos;
- três lavagens sucessivas com água destilada estéril por 5 minutos cada uma.

Com a utilização de cloreto de mercúrio (Figura 3) se obteve 97% de explantes viáveis em jacinto, frente a 45% quando não se utilizou cloreto de mercúrio, e de 95% em narciso, frente a 45% quando não se utilizou cloreto de mercúrio. A tulipa chegou a 68% de viabilidade de explantes, frente a 20% quando não se utilizou cloreto de mercúrio, e para íris a diferença foi pequena (54% descontaminados com cloreto de mercúrio, 45% sem cloreto de mercúrio).

Em casos de difícil assepsia, a utilização de cloreto de mercúrio (a 0,25‰ por 6 horas ou a 0,5‰ por 1 a 3 horas), com frequência tem dado melhores resultados que o hipoclorito de cálcio ou de sódio (água sanitária) (7).

Ainda que os resultados sejam melhores, deve-se levar em conta que a utilização de mercuriais acarreta maiores gastos, tanto econômicos como de ordem temporal e humana, assim como problemas derivados de sua elevada toxicidade. Contudo, um percentual de 98% de explantes viáveis, como obtido

neste ensaio, e levando em conta que a assepsia de bulbosas é muito trabalhosa e difícil de conseguir, faz com que sua utilização deva ser considerada.

Ensaio 4 - Assepsia de jacinto, tulipa, íris e narciso com utilização de água destilada a 54°C

O procedimento se realizou como se descreve a seguir:

- manutenção dos passos a, b, c e d do ensaio 1;
- imersão das escamas em água destilada a 54°C por 1 hora;
- imersão em solução aquosa de água sanitária comercial a 20% por 25 minutos;
- três lavagens sucessivas com água destilada estéril por 5 minutos cada uma.

A utilização do tratamento com água a 54°C (Figura 4) praticamente duplicou a efetividade na descontaminação dos explantes das quatro espécies, no entanto a regeneração diminuiu muito, fato que pode limitar a utilização desta técnica asséptica.

Em trabalho com narciso foi verificado que o tratamento com água a 54°C por 1, 2 ou 3 horas diminuía a contaminação de 45 para 3%, sem afetar a produção de brotos, contudo o peso fresco diminuía. O uso de banho a 50°C foi menos efetivo no controle da contaminação, mas temperaturas de 58 e de 62°C reduziram a capacidade de regeneração. Não foi encontrada diferença significativa entre tratamento com calor e tratamento de descontaminação com imersão em hipoclorito sódico por 30 minutos e sem calor. Foi sugerido que a contaminação está localizada no interior dos tecidos do bulbo (2).

Ensaio 5 - Assepsia de jacinto com utilização de miconazol

O miconazol é um produto farmacêutico que se comercializa com o nome de Daktarin®, um composto com 2g de nitrato de miconazol e 100g de excipiente c.s.p. É um potente antimicótico de amplo espectro, também de atividade antibacteriana fren-

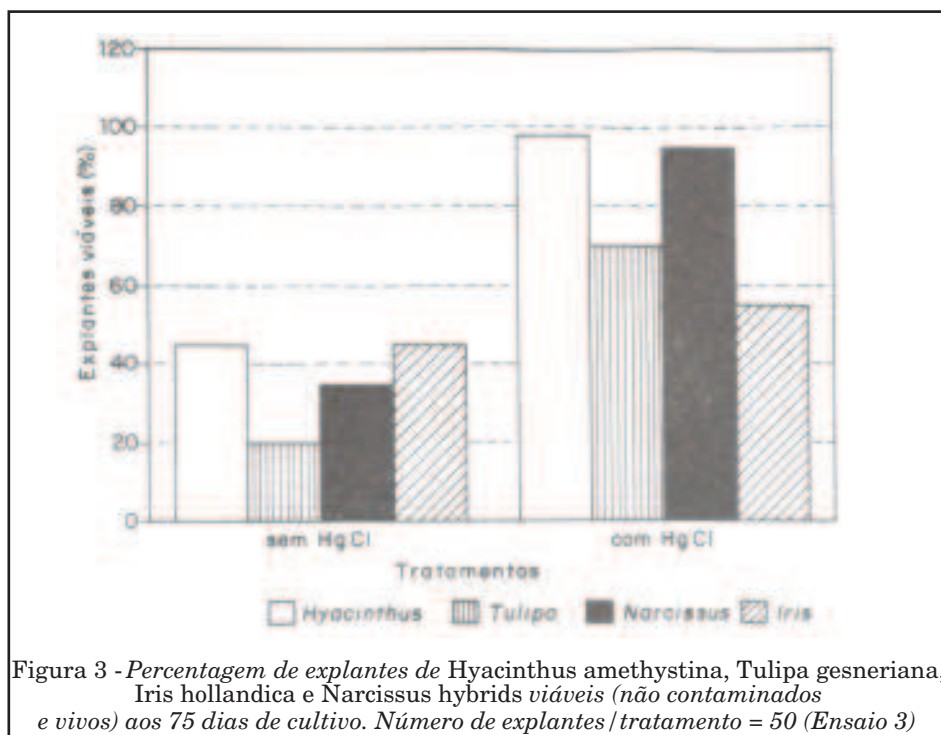


Figura 3 - Percentagem de explantes de *Hyacinthus amethystina*, *Tulipa gesneriana*, *Iris hollandica* e *Narcissus hybrids* viáveis (não contaminados e vivos) aos 75 dias de cultivo. Número de explantes/tratamento = 50 (Ensaio 3)

te a cocos e bacilos gram-positivos. Para diluí-lo se utiliza o dimetil-sulfóxido (40mg/litro), quando se apresenta em forma de pó.

O produto foi introduzido ao meio, com seringa e filtro esterilizados (processo de filtração) e em câmara de fluxo laminar (condições assépticas),

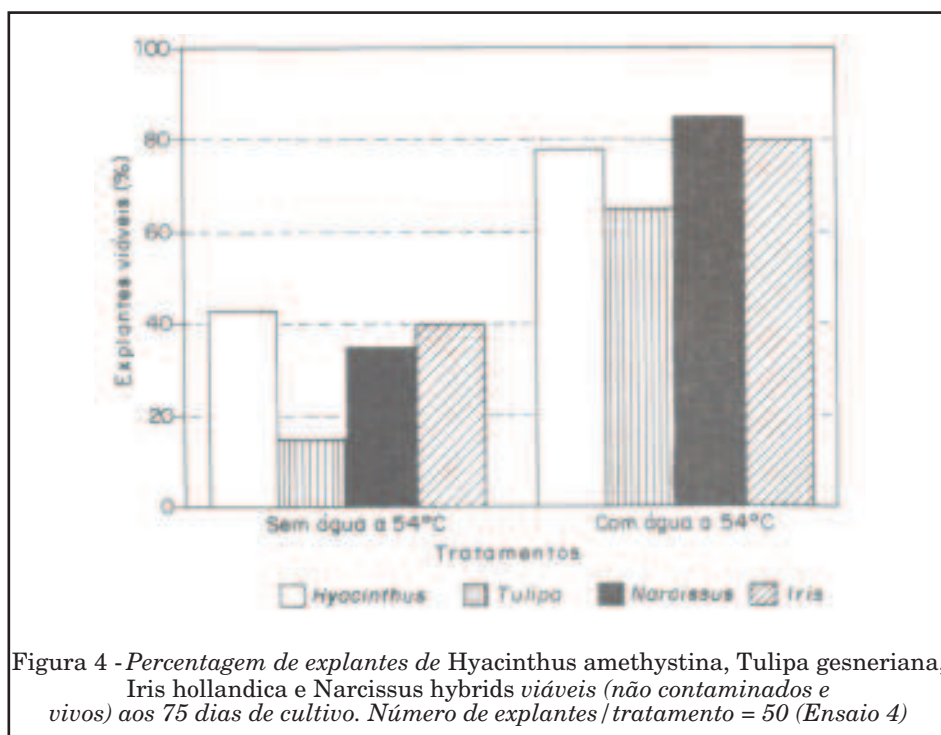


Figura 4 - Percentagem de explantes de *Hyacinthus amethystina*, *Tulipa gesneriana*, *Iris hollandica* e *Narcissus hybrids* viáveis (não contaminados e vivos) aos 75 dias de cultivo. Número de explantes/tratamento = 50 (Ensaio 4)

estando o meio a uma temperatura média de 50°C, depois de haver sido previamente autoclavado a uma pressão de 1kg/cm² e 120°C de temperatura durante 20 minutos. Para cada 20ml de meio em cada recipiente se adicionou 2ml da solução com miconazol.

Os tratamentos testados estão na Tabela 3.

Para todos os tratamentos se realizou, inicialmente, o mesmo processo de desinfecção do material descrito nas etapas a, b, c e d do primeiro ensaio - Fase 1.

Com a finalidade de simplificar esta metodologia, comparou-se com o fato de adicionar o miconazol aos recipientes de cultivo antes de autoclavado.

Neste processo, a concentração ensaiada foi de 20mg/litro de miconazol em um único período de tempo de 60 dias, sem subcultivos. A forma de avaliação foi mantida. Este procedimento também se mostrou eficaz em sua finalidade.

Para jacinto (Figura 5), foi constatado que os tratamentos com miconazol permitiram um bom controle da contaminação dos bulbos, e este controle foi ainda melhor quando se utilizou conjuntamente o cloreto de mercúrio. Contudo, o cloreto de mercúrio sozinho apresentou resultados superiores ao miconazol sozinho.

Os trabalhos de investigação em cultivo *in vitro*, quando o material de partida é uma espécie de bulbosa, apresentam a dificuldade adicional de a assepsia destes bulbos ser muito trabalhosa e delicada. Variações sensíveis em condições de esterilização e no meio de cultivo costumam influenciar qualitativa e quantitativamente os resultados.

Devido a problemas que possam vir a surgir pelo emprego de cloreto de mercúrio na assepsia dos bulbos, os tratamentos que empregam o miconazol como agente asséptico podem ser recomendados e permitem um bom controle da contaminação. A concentração de 20mg/litro de miconazol foi o tratamento mais eficaz, não apresentando problemas quanto à capacidade de regeneração dos explantes, chegando a 98,5% de explantes não contaminados e vivos (com cloreto de mercúrio) e a 96% de explantes não contaminados e vivos (sem cloreto de mercúrio).

Com o uso do miconazol foi possível conter a proliferação de numerosos tipos de fungos e bactérias em quinze espécies de plantas, mantendo uma relação de crescimento positivo, ainda que, em duas espécies, o crescimento de brotos e calos diminuiu (8).

Conclusões

- De todos os ensaios realizados buscando eliminar a contaminação dos bulbos de jacinto, tulipa, íris e narciso, se pode sugerir o emprego de uma concentração de álcool de 80% (v/v) e de

Tabela 3 - *Tratamentos testados*

Tratamento	Miconazol (mg/litro)
I. Igual ao tratamento 2 do segundo ensaio - Fase 2 (imersão em álcool a 80% por 1 minuto e imersão em água sanitária comercial a 20% por 25min, com algumas gotas de Tween 20, seguido de três lavagens com água estéril por 5 minutos cada uma)	0
II. Igual ao passo I	+10
III. Igual ao passo I	+20
IV. Igual ao segundo procedimento do ensaio 3, ou seja, com cloreto de mercúrio	0
V. Igual ao passo IV	+10
VI. Igual ao passo IV	+20

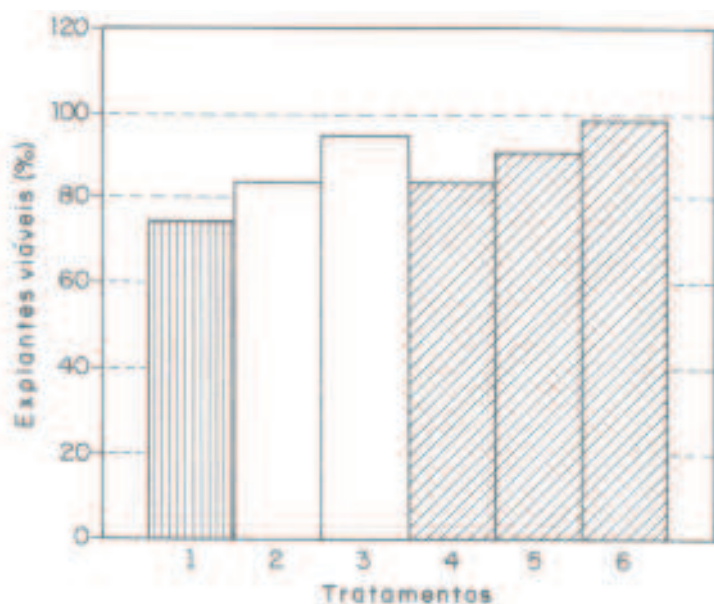


Figura 5 - *Porcentagem de explantes de Hyacinthus amethystina viáveis (não contaminados e vivos) aos 60 dias de cultivo. Número de explantes/tratamento = 54*

água sanitária comercial de 20% (v/v), com tempos de imersão de 30 segundos e 25 minutos, respectivamente, seguidas da utilização do miconazol (no caso do jacinto), associada ou não ao emprego de cloreto de mercúrio.

• Quanto ao emprego de água quente durante o processo de assepsia, haveria que tentar estudá-lo melhor, já que permite controlar a contaminação dos bulbos reduzindo o uso de produtos químicos. O problema reside em que, de alguma maneira, a água, em temperatura elevada, inibe a capacidade de regeneração dos bulbos.

Literatura citada

1. KUNNEMAN, B.P.A.M.; ALBERS, M.R.J. Snelheid grootste struikelblok; weefselweek pioen gaat niet over rozen. *Bloembollencultuur*, v.100, n.23, p.16-17, 1989.
2. HOLG, G.M.C.; VAN der LINDE, P.C.G. Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell*, Rockville, v.31, p.75-79, 1992.
3. BERGOÑON, S.; RIEIRA, R.; SELLES, M.; ROIG, N.; CODINA, C. Efecto de diferentes tratamientos en la asepsia de explantos en especies de *Narcissus* y su influencia en la regeneración de brotes. In: REUNIÓN NACIONAL DE LA S.E.F.V., 10 y CONGRESO HISPANO-PORTUGUES DE FISILOGIA VEGETAL, 3., 1993, Pamplona. *Anales*. Pamplona: 1993.
4. PAEK, K.Y.; THORPE, T.A. Hyacinth. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.R.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. *Handbook of plant cell culture*. New York: McGraw-Hill, 1990. v.5, p.439-471.
5. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
6. VAN der LINDE, P.C.G.; SCHIPPER, J.A. Micropropagation of *Iris* with special reference to *Irisxhollandica* Tub. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v.20, p.173-197.
7. MARGARA, J. *Multiplificación vegetativa y cultivo in vitro; los meristemos y la organogénesis*. Madrid: Mundi-Prensa, 1988. 232p.
8. TYNAN, J.L.; CONNER, A.J.; MACKNIGHT, R.C.; POULTER, R.T.M. Miconazole: an effective antifungal agent for plant tissue culture. *Plant Cell*, Rockville, v.32, p.293-301, 1993.

Mario Angelo Vidor, eng. agr., Ph.D., Cart. Prof. 45.918-D, CREA-RS, EPAGRI, Estação Experimental de Lages, C.P. 181, Fone (049) 224-4400, Fax (049) 222-1957, 88502-970 Lages, SC.

□

Equipamentos para Fruticultura profissional



Tesouras de poda
FELCO

Canivetes de enxertia
WENGER

Pneumático para poda
MAIBO

Trituradores italianos
para roçar e picar galhos de poda na
fruticultura

Empilhadeiras italianas
altura até 4.5m, com fixador de carga
hidráulico ou lateral dumper para bins

LIMMAT

Vacaria, RS Fone (054) 231-3634