

Controle da Contaminação do Cultivo de *Sinningia aghensis* Chautems *in vitro*

Nicola Duarte Cano¹, Pollyana Lima Peterle¹ e Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol²

Introdução

Sinningia aghensis Chautems (Gesneriaceae) é uma espécie herbácea, tuberosa, perene e rupestre endêmica do Espírito Santo (Fig. 1A). A família Gesneriaceae tem ampla distribuição no Brasil e o gênero *Sinningia* é encontrado em vários estados, principalmente na Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pernambuco e Espírito Santo [1]. Plantas desse gênero são conhecidas como rainhas-do-abismo em algumas localidades do Brasil, devido a sua beleza e seu hábito de crescimento em precipícios [2].

São conhecidas atualmente 70 espécies dentro do gênero e a grande maioria está concentrada em áreas de Floresta Atlântica [2]. *S. aghensis* se encontra ameaçada de extinção conforme lista do IPEMA [3], principalmente pela degradação do seu hábitat natural, o que tem restringido o número de sua população em condições naturais. Dada a dificuldade de coleta de sementes para estudos de germinação, uma das alternativas para aumentar o número de indivíduos dessa espécie está nas técnicas de cultura de tecidos vegetais. Trata-se de uma alternativa para a obtenção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo, garantindo uniformidade genética e qualidade fitossanitária do material [4]. Esse tipo de propagação constitui uma ferramenta importante para a reposição de espécies nativas com potencial econômico-ecológico ameaçadas de extinção [5]. Tem sido considerada, também, importante ferramenta em trabalhos de conservação através da implantação de bancos de germoplasma *ex situ* [6].

Entretanto, o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas, em função de suas características peculiares, apresenta problemas, tais como oxidação e contaminação. A contaminação está associada ao tipo de planta, da procedência e das condições ambientais em que se desenvolve. Em algumas espécies, o material vegetal proveniente de condições de campo pode apresentar elevada concentração de microrganismos [5]. Outro fator agravante que contribui para a contaminação dos explantes quando cultivados *in vitro* é a presença de tricomas foliares (Fig. 1B) onde os microrganismos se alojam [7]. Esse caso é particular em *S. aghensis*.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para controlar a contaminação de explantes de *S. aghensis* quando cultivados *in vitro*.

Material e métodos

Plantas de *S. aghensis* foram coletadas, aleatoriamente, no Morro do Cruzeiro, município de Vila Velha (20° 19' 49"S, 40° 20' 27"W), Espírito Santo. As plantas encontravam-se na fase vegetativa, sendo assim foram envasadas com terra e cultivadas na casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (Fig. 1C) durante uma semana para aclimação.

Foram utilizadas, como fonte de explantes, folhas que foram submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. Primeiramente, as folhas foram lavadas com água corrente e sabão neutro líquido. O material foi dividido em dois lotes: com e sem tricomas. Os tricomas foram retirados com o auxílio de uma gilete. Cada lote foi subdividido em quatro tratamentos: (1) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 40 % (v/v) durante 20 minutos e seguido de desinfestação em álcool 70 % durante 1 minuto; (2) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 40 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % aplicado na folha com algodão; (3) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % aplicado na superfície da folha com algodão; e (4) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % durante 1 minuto. Além desses tratamentos que consistiram na retirada ou não dos tricomas, foram feitos discos foliares na região da nervura central e removidos a epiderme com estilete ou gilete. Os discos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % durante 1 minuto (Tab. 1).

Antes da inoculação, os explantes (discos foliares, n=10) foram enxaguados por três vezes com água destilada autoclavada em condições asséptica em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog [8] sem fitoregulador de crescimento, contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 g.L⁻¹ de mio-inositol, 7,5 g.L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,9 e autoclavado por 20 minutos a 121° C e 1 atm. Após a inoculação, o material foi acondicionado em sala de crescimento em luz contínua e temperatura constante de ± 26° C.

As avaliações foram realizadas aos 15 dias,

1. Aluno de graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514 – Campus Universitário de goiabeiras. CEP: 29075-910 – Vitória – ES. E-mail: nicolacano@yahoo.com.br; pollyanapeterle@yahoo.com.br

2. Professor Adjunto do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514 – Campus Universitário de goiabeiras. CEP: 29075-910 – Vitória – ES. E-mail: cuzzuol@npd.ufes.br
Apoio financeiro: UFES.

analisando-se a porcentagem de contaminação.

Resultados e discussão

Os melhores resultados referentes a desinfestação eficiente, foram obtidos nos tratamentos em que foram feitos discos foliares na região da nervura central e removidos a epiderme com estilete ou gilete (Fig. 2). No primeiro, não houve nenhuma contaminação, enquanto no segundo apenas 20 % dos explantes foram contaminados. No entanto, é necessário um prazo maior para a avaliação da formação de calos, uma vez que os tratamentos podem ter sido muito drásticos, pois houve a retirada da epiderme, o que poderia estar afetando o metabolismo e sobrevivência dos explantes, causando necrose do tecido.

Resultados satisfatórios, quanto a desinfestação, também foram obtidos nos seguintes tratamentos dos lotes contendo folhas sem tricomas: (3) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % aplicado na superfície da folha com algodão; e (4) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % durante 1 minuto. Em ambos apenas 50 % dos explantes foram contaminados. Esses tratamentos se destacam pelo fato da epiderme ter sido mantida, indicando a integridade celular e do metabolismo vegetal, possibilitando a formação de calos.

Assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho foram significativos, uma vez que se buscou contribuir para estabelecer um protocolo para o controle da contaminação de explantes foliares de *S. aghensis* para a micropropagação *in vitro* dessa espécie ameaçada de extinção da flora do Espírito Santo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Jéssica de Almeida Boger pelo auxílio técnico.

Referências

- [1] CHAUTEMS, A. 1991. A família Gesneriaceae na região cacauceira da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 14 (1): 51-59.
- [2] PEIXOTO, M. & SALVIANI, E.R. [Online]. *Olho vivo*. Homepage: <http://www.cuestajardins.com.br/?id=149&codigo=430>
- [3] IPEMA. 2006 [Online]. *Lista da fauna e flora ameaçada de extinção no estado do Espírito Santo*. Homepage: http://www.ipema-es.org.br/hp/Download/Diário_Oficial_do_ES_dia_16-06-2005_decreto.pdf
- [4] OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. 2001. Concentração de BAP e a eficiência da micropropagação de bananeira tetraplóide. *Scientia Agrícola, Piracicaba*, 58 (1): 73-78.
- [5] SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. & SOUZA, V.C. 2001. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. *CERNE*, 7 (2): 117-123.
- [6] GUERRA, M. P.; VESCO, L.L.D.; PESCADOR, R. SCHUELTER, A.R. & NODARI, R.O. 1999. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, 34 (9):1557-1563.
- [7] PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. 1995. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3ed. São Paulo: Ceres, 1:417-453.
- [8] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Tabela 1. Delineamento experimental dos tratamentos de controle da contaminação de explantes de *Sinningia aghensis* cultivados *in vitro*.

Tratamento pré-desinfestação	Desinfestação com hipocloreto comercial durante 20 min.	Desinfestação com álcool 70%
Tricomas não removidos	Solução a 40%	Imerso em solução durante 1 min.
	Solução a 100%	Aplicação com algodão sobre a epiderme
Tricomas removidos	Solução a 40%	Imerso em solução durante 1 min.
	Solução a 100%	Aplicação com algodão sobre a epiderme
Epiderme removida com estilete	Solução a 100%	Imerso em solução durante 1 min.
Epiderme removida com gilete		

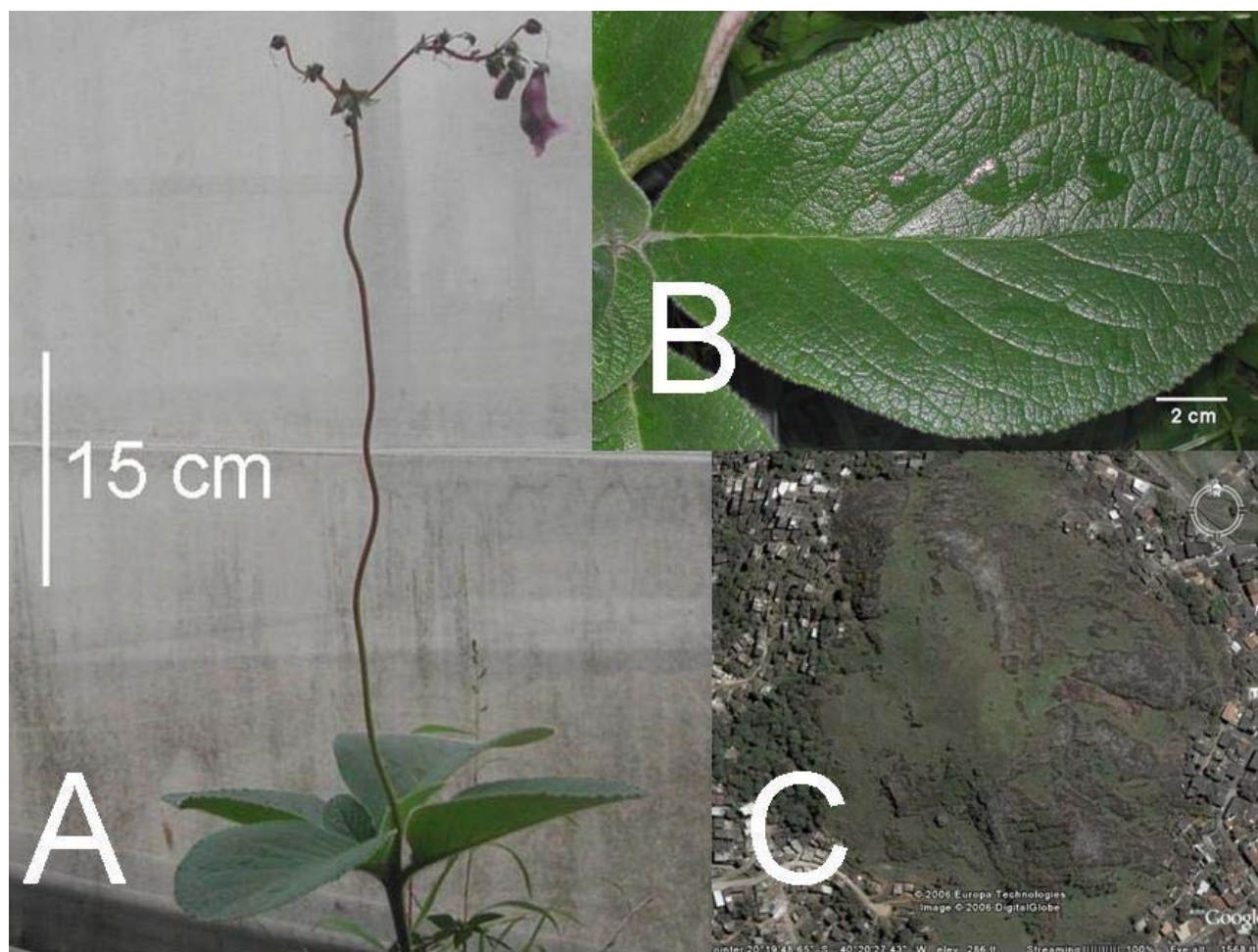


Figura 1. *Simningia aghensis* Chautems (Gesneriaceae), espécie endêmica do Espírito Santo **A.** Hábito rupestre; **B.** Folha mostrando a presença de tricomas; **C.** Imagem de satélite do local da coleta (Morro do Cruzeiro).

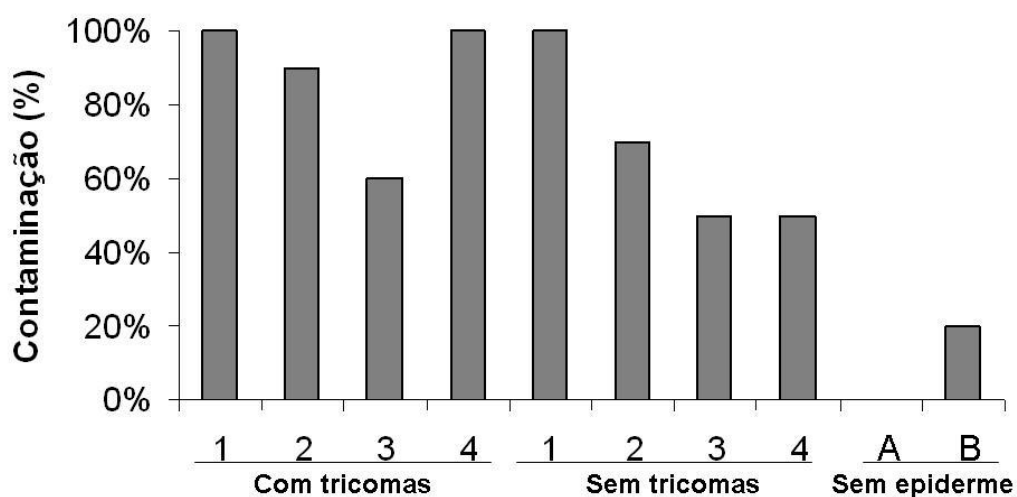


Figura 2. Dados percentuais de taxa de contaminação em explantes de *S. aghensis* cultivados *in vitro*. Tratamentos com ou sem tricomas: (1) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 40 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % durante 1 minuto; (2) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 40 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % aplicado na folha com algodão; (3) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % aplicado na superfície da folha com algodão; e (4) lavagem em solução de hipoclorito de sódio comercial a 100 % (v/v) durante 20 minutos, seguido de desinfestação em álcool 70 % durante 1 minuto. Tratamentos sem epiderme: (A) epiderme removida com estilete e (B) epiderme removida com gilete.