

## Assepsia de rizomas e inoculação de ápices caulinares de *Curcuma alismatifolia* *in vitro*

Rodrigues, Tatiana Michlovská<sup>1</sup>; Luz, José Magno Queiroz<sup>2</sup>; Lino, Leandro de Oliveira<sup>3</sup>; Rodrigues, Carlos Ribeiro<sup>4</sup>; Melo, Geraldo Batista de<sup>5</sup>

Engenheira Agrônoma, Dr<sup>a</sup> em Fitotecnia, Pós-doutoranda na Universidade Federal de Uberlândia/UFU - Instituto de Ciências Agrária/ICIAG, Av. Amazonas,s/n BL 2E, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia/MG, e-mail: [tatiana\\_mrodrigues@yahoo.com.br](mailto:tatiana_mrodrigues@yahoo.com.br); <sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, Dr em Fitotecnia, Professor do Instituto de Ciências Agrária, UFU-ICIAG; <sup>3</sup> Acadêmico do Curso de Agronomia da UFU-ICIAG; <sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo, Dr em Solos e Nutrição de Plantas, Pós-doutorando na UFU-ICIAG, e-mail: [carlos\\_rrodrigues@yahoo.com.br](mailto:carlos_rrodrigues@yahoo.com.br); <sup>5</sup> Odontólogo, Dr. em Genética e Bioquímica, Professor do Instituto de Ciências Biomédicas, UFU-ICB.

### INTRODUÇÃO

O cultivo de flores tropicais tem-se tornado uma atividade agrícola cada vez mais importante no Brasil, devido à alta demanda do mercado de plantas ornamentais. Dentre as famílias com potencial para expansão deste mercado, está a Zingiberaceae que possui o gênero *Curcuma* como destaque. Este gênero tem espécies que são utilizadas como tempero e também apresentam propriedades medicinais, óleos essenciais, além de serem utilizadas como flor de corte, de vaso e como plantas aplicadas ao paisagismo. Como produto ornamental, a *C. alismatifolia* é comercializada no mercado externo como flor de corte e como rizoma (Pinto & Graziano, 2003).

A propagação do gênero *Curcuma* é basicamente por divisão de touceiras rizomatosas. Devido a esta prática de propagação vegetativa tradicional, existe a preocupação de disseminação de doenças causadas pelos agentes *Ralstonia solanacearum* (Thammakijawat, et al., 1999; Vudhivanich, 2002), *Meloidogyne incognita*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* (Lins & Coelho, 2004).

Neste contexto, com a propagação *in vitro*, estes problemas são minimizados, pois esta técnica possibilita a aquisição de material propagativo vegetal livre de fitopatógenos. Além disso, através da micropropagação pode-se obter maior quantidade de mudas em um curto período de tempo, quando comparado com a propagação vegetativa tradicional.

A primeira etapa da micropropagação é o estabelecimento *in vitro* do material a ser multiplicado e para tanto, tem de se determinar a melhor metodologia para desinfestação dos explantes a serem inoculados.

Em muitos casos a presença de fungos e bactérias ocorre poucos dias após a inoculação. Em alguns casos a presença de bactérias e fungos nas plantas é detectada após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está em produção. Além disso, por serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação dos explantes para a inoculação *in vitro*. Quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH) tornam-se favoráveis ao seu desenvolvimento, os fitopatógenos passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes, podendo levá-los rapidamente à morte. Esta deterioração dos explantes está relacionada com a produção de metabólitos fitotóxicos pelos fitopatógenos, tais como os ácidos láctico e acético, cianeto (Pereira et al., 2003).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo de determinar uma assepsia específica dos rizomas de *C. alismatifolia* reduzindo a contaminação *in vitro* por fitopatógenos, além de detectar a presença de fungos e bactérias e identificá-los por meio de coloração de Gram.

### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil. Após aquisição dos rizomas de *C. alismatifolia* em vasos, estes foram mantidos em casa de vegetação para sua manutenção até momento da retirada dos explantes (ápices caulinares).

Para a montagem do experimento os rizomas foram lavados em água corrente, fazendo uso de detergente neutro e escova para retirada do excesso de solo, tomando cuidado para não danificar o tecido do rizoma. Logo em seguida foi realizada uma pré-asepsia que consistiu em imersão dos rizomas em água a 52°C durante 10 minutos, de forma que possa contribuir para a redução da contaminação bacteriana. Em seguida, foram imersos em álcool 70% por 2 minutos e posterior imersão destes em solução comercial de hipoclorito de sódio a 20% (v.v<sup>-1</sup>) por 5 minutos acrescido de 2 gotas de detergente neutro.

O material vegetal previamente limpo foi colocado imediatamente em frascos contendo água destilada e autoclavada e levados à câmara de fluxo laminar para aplicação dos tratamentos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 8 com quatro repetições, sendo cinco diferentes períodos de imersão dos brotos em solução comercial de hipoclorito de sódio (0; 10; 20; 30 e 40 minutos) e oito concentrações deste (0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70% v v<sup>-1</sup>). Após imersão nos tratamentos, os rizomas foram enxaguados três vezes em água destilada e autoclavada. Cada tubo de ensaio continha um ápice caulinar e este considerado uma parcela e cada repetição foi composta por quatro parcelas.

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962) (MS) contendo 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) acrescido de 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e o pH será ajustado para 5,8. Posteriormente realizou-se autoclavagem à 121°C, 1 atm por 20 minutos, e após o resfriamento e solidificação do meio inoculou-se os ápices caulinares que foram extraídos dos rizomas com auxílio de uma lupa. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C e com fotoperíodo de 16 horas de luz durante 30 dias.

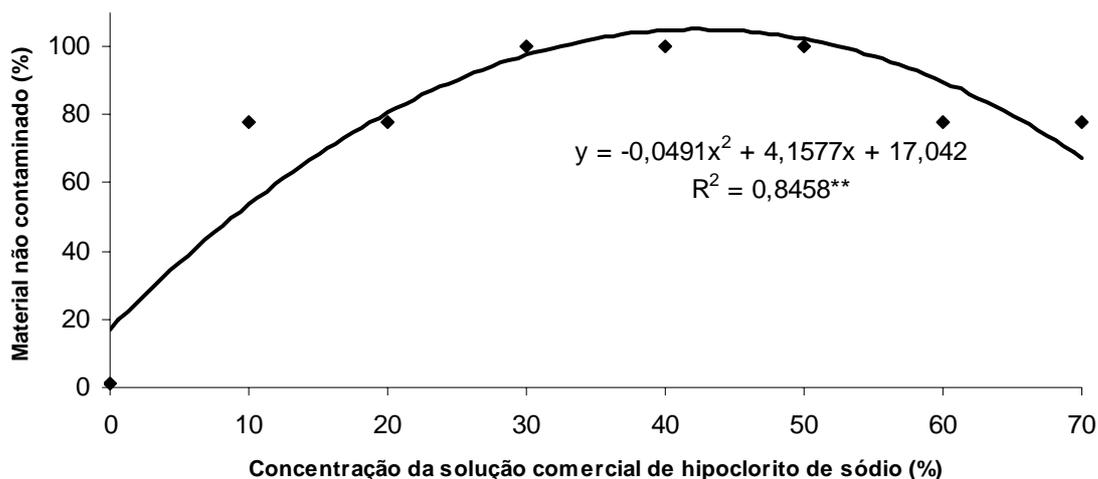
A variável analisada após 30 dias da inoculação foi a porcentagem de material não contaminado. O resultado obtido foi submetido à análise de variância com o auxílio do programa SISVAR<sup>®</sup>. Os dados em porcentagem por não apresentarem homogeneidade e normalidade, foram transformados para:  $\arcsen \sqrt{x/100}$  (Banzatto & Krocka, 1992).

Observou-se também o tipo de contaminantes (fungo e/ou bactéria) e sua identificação e separação por grupo, respectivamente. As colônias bacterianas foram isoladas com base nas características fenotípicas (pigmentação) e realizou-se o teste bacteriológico de coloração de Gram (Humphries, 1974).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de interação entre o tempo de imersão e a concentração da solução comercial de hipoclorito de sódio houve efeito significativo de 1% de probabilidade pelo teste F.

Somente nos tratamentos onde os rizomas permaneceram por 40 minutos em imersão, obteve-se resposta significativa de 1% de probabilidade e tendo uma curva quadrática. A concentração da solução comercial de hipoclorito de sódio em porcentagem que proporcionou melhor resultado de assepsia foi em torno de 40% (v v<sup>-1</sup>), como mostra a Figura 1.



**FIGURA 1** – Porcentagem de material não contaminado em relação à concentração da solução comercial de hipoclorito de sódio (%v v<sup>-1</sup>) no tempo de 40 minutos em imersão de rizomas de *C. alismatifolia*.

Trabalhos foram feitos com brotos de *Curcuma zedoaria*, onde se preparava o rizoma, cultivando-o até formação dos brotos e estes eram desinfestados. A concentração da solução comercial de hipoclorito de sódio aplicada foi de 20% e imersão em 20 minutos (Mello et al., 2000). A diferença entre os resultados de *Curcuma zedoária* e da *C. alismatifolia* aqui desenvolvido, deve-se a diferentes tecidos vegetais em que se extraiu o explante. Em *Curcuma zedoária*, Mello et al., (2000) fez uso de tecido novo e tenro, porém, para que isto ocorra é necessário esperar que os ápices caulinares presentes nos rizomas se desenvolvam até a formação dos brotos e então realizar a retirada do ápice caulinar. Já na *C. alismatifolia*, foi utilizado tecido mais velho, que ficou diretamente em contato com o substrato, as remoções dos ápices caulinares ocorreram diretamente do rizoma, desta maneira, o período de espera da formação dos brotos não é mais necessário.

No presente trabalho foi realizada a remoção dos ápices caulinares diretamente do rizoma, sem a espera de formação de brotações, para agilizar o processo de instalação do material vegetal no cultivo *in vitro*. Trabalho similar foi realizado por Debiasi et al., (2003) em que se retirou uma porção do rizoma que continha o ápice caulinar, reduzindo o tamanho inicial do explante da espécie de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) para a assepsia.

Após o período de trinta dias de inoculação não foi detectado a contaminação dos explantes por fungos, mostrando que todos os tratamentos testados foram eficientes no combate à estes fitopatógenos. Desta maneira, pelos resultados obtidos, somente a realização da pré-assepsia foi suficiente para que o explante ficasse isento de contaminantes fúngicos. Porém foi notada a presença de bactérias, as quais se desenvolviam em torno do explante, o que mostra ser uma bactéria endofítica presente nos tecidos vegetais.

Um dos maiores problemas no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais são as contaminações bacterianas. Pereira et al., (2003) verificaram a contaminação por bactérias endofíticas na micropropagação de batata.

Em alguns casos não se evidencia de imediato a presença de bactérias nas plantas, sendo detectada somente após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está propagado. Além disso, por serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação dos explantes.

A identificação das colônias bacteriana foram tanto Gram negativas (coloração em rosa) e Gram positivas (coloração em azul) e ambas em formato de bastonetes longos.

Se faz necessário mais estudos na identificação das bactérias, com o intuito de se utilizar antibióticos específicos durante o cultivo *in vitro*, para a inibição e o combate do

crescimento e desenvolvimento dessas bactérias que estão presentes nos tecidos vegetais e/ou oriundas por manipulação do explante, durante o procedimento de inoculação.

## CONCLUSÃO

Para a assepsia de rizomas de *C. alismatifolia* o melhor tratamento foi o de 40 minutos de imersão numa solução comercial de hipoclorito de sódio à concentração de 40% (v v<sup>-1</sup>).

Não foi detectado a presença de agentes fúngicos no cultivo *in vitro* de ápices caulinares de *C. alismatifolia*, porém ocorreu o surgimento de bactérias em torno do explante, indicando que a bactéria é de origem endofítica. Foram encontradas tanto bactérias Gram positivas como negativas em forma de bastonetes.

São necessários mais estudos sobre a identificação de bactérias, de forma que possa minimizar a desinfestação dos explantes e favorecer o estabelecimento de ápices caulinares de *C. alismatifolia*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANZATTO, D. A. & KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal, FUNEP, 1992.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **R. Bras. Agrocência**, v. 10, n. 1, p. 67-70, jan-mar, 2004.

HUMPHRIES, J. **Bacteriology**. London: J. Murray, 1974. 92 p.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v 29, n. 3, Brasília, May/June, p. 332-335, 2004.

MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Quantificação da micropropagação de *Curcuma zedoaria* ROSCOE. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, Piracicaba Oct./Dec, 2000.

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

PEREIRA, J. E.S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003. et al., 1991).

PINTO, A. C. R. & GRAZIANO, T. T. Potencial ornamental de *Curcuma*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 9, n. 2, p.99-109, 2003.

THAMMAKIJJAWAT, P.; THAVEECHAI, N.; PARADHONUWAT, A.; WANNAKAIROJ, S.; SUTHIRAWUT, S. Bacterial rhizome rot of patumma and detection of seed-borne rhizome. **In: 37th Kasetsart University Annual Conference**, 3-5 February, 1999. Ed. Oates, C. G. Text and Journal Publication Co, Ltd, Bangkok, Thailand:.. 295-302. [Thai]

VUDHIVANICH, S. Effect of Soil Amendment with Urea and Calcium Oxide on Survival of *Ralstonia solanacearum*, the Causal Agent of Bacterial wilt or Rhizome Rot of Ginger. **The Kasetsart Journal (Natural Sciences)**, v. 36, p. 242-247, 2002.

PALAVRAS-CHAVES

*Curcuma alismatifolia*, desinfestação, micropropagação, Zingiberaceae