

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALICE PEREIRA VALADARES

**PROTOCOLO PARA DESINFECÇÃO DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO
*CATTLEYA***

PATOS DE MINAS

JUNHO 2023

ALICE PEREIRA VALADARES

**PROTOCOLO PARA DESINFECÇÃO DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO
*CATTLEYA***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa.

PATOS DE MINAS

JUNHO 2023

ALICE PEREIRA VALADARES

Protocolo para desinfecção de orquídeas do gênero *Cattleya*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Aulus Estevão de Deus Barbosa – IBTEC/UFU
Presidente

Me. Terezinha Teixeira – IBTEC-UFU
Membro

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte – IBTEC-UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, 22 de junho de 2023.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

V136 2023	<p>Valadares, Alice Pereira, 1994- Protocolo para desinfecção de orquídeas do gênero Cattleya [recurso eletrônico] / Alice Pereira Valadares. - 2023.</p> <p>Orientador: Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biotecnologia. I. Barbosa, Aulus Estevão Anjos de Deus, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 60</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por atender meu pedido e me ajudar a chegar até aqui.

Agradeço a minha família pelo apoio financeiro em tudo que eu precisei, pela ajuda que sempre esteve lá quando eu precisei também, pelo amor, e pela torcida positiva especialmente da minha mãe.

Agradeço aos meus amigos que fizeram dessa jornada mais leve.

Agradeço ao meu orientador Prof. Aulus por ter me aberto portas, e a Sarah Novais, proprietária do Laboratório Jardim com Flores pela oportunidade para o projeto de iniciação científica.

Agradeço à Liliane por me ajudar de forma tão eficaz, pra assim, colher os frutos que tenho hoje.

RESUMO

Na dádiva de “florir” o emocional humano, o cultivo de orquídeas ocorre a cerca de 4000 anos. O gênero *Cattleya* possui 108 espécies sendo o maior gênero de orquídeas. Porém, devido a sua beleza, são retiradas excessivamente da natureza, levando inúmeras espécies à extinção. Adicionalmente, são de difícil propagação em condições naturais devida à baixa taxa de germinação de suas sementes que não possuem endosperma. A micropropagação é uma alternativa para a produção de orquídeas, produzindo plantas elite, em pouco espaço físico e em curto período de tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes e evitando também patógenos vegetais. Neste sentido, este trabalho teve o objetivo de estabelecer as condições de desinfecção para cultivo *in vitro* de orquídeas *Cattleya*. Neste trabalho, o meio utilizado no cultivo das orquídeas foi o MS/2, suplementado com hormônios e compostos adicionais. A desinfecção foi realizada em três tecidos diferentes: O broto inteiro, meristemas isolados e meristemas com tecidos circundantes. De cada broto, foi possível obter 3 meristemas. A desinfecção a partir de brotos inteiros, imersos em hipoclorito 0,75% por 12, 15, e 20 minutos não foi alcançada, o que exigiu a desinfecção a partir de tecidos em fragmentos menores. Foram usados o meristema isolado e o meristema com tecidos circundantes. Esses tecidos foram desinfectados em diferentes tempos e concentrações de hipoclorito de sódio e Kathon. Enfim, o melhor resultado foi utilizando o meristema com tecidos circundantes, que protegem o meristema reduzindo a oxidação. Esse tecido foi desinfectado com mais eficiência usando hipoclorito de sódio 0,5% por 30 minutos. O trabalho foi feito visando obter mais tecidos desinfectados e experimentos adicionais serão necessários para alcançar a micropropagação de orquídeas *Cattleya*.

Palavras-chave: Propagação. Meristemas. Cultivo “in vitro”. Cultura de tecidos. Contaminação endofítica.

ABSTRACT

In the gift of “blossoming” the human emotional, orchids cultivation occurs about 4000 years ago. Cattleya genus has 108 species being the largest orchids genus. However, due to their beauty, they are taken excessively from nature, leading countless species to extinction. Additionally, they are difficult to propagate under natural conditions due to the low germination rate of their seeds, which do not have an endosperm. Micropropagation is an alternative for orchid production, producing elite plants in a small physical space and in a short period of time, regardless of limiting climatic factors and also avoiding plant pathogens. In this sense, this work aimed to establish disinfection conditions for in vitro cultivation of Cattleya orchids. In this work, the medium used in the orchids cultivation was MS/2, supplemented with hormones and additional compounds. Disinfection was performed on three different tissues: the entire bud, isolated meristems and meristems with surrounding tissues. From each shoot, it was possible to obtain 3 meristems. Disinfection from whole shoots immersed in 0.75% hypochlorite for 12, 15, and 20 minutes was not achieved, which required disinfection from tissues into smaller fragments. The isolated meristem and the meristem with surrounding tissues were used. These tissues were disinfected at different times and concentrations of sodium hypochlorite and Kathon. Anyway, the best result was using the meristem with surrounding tissues, which protect the meristem reducing oxidation. This tissue was most efficiently disinfected using 0.5% sodium hypochlorite for 30 minutes. Work has been done to get more tissues disinfected and additional experiments will be needed to achieve micropropagation of Cattleya orchids.

Keywords: Propagation. Meristems. Cultivation “in vitro”. Tissue culture. Endophytic contamination.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	A Produção de flores no Brasil.....	9
1.2	Orquídeas.....	10
1.3	A cultura de tecidos vegetais.....	12
1.4	A cultura de tecidos de orquídeas <i>Cattleya</i>	16
1.5	Microrganismos endofíticos.....	17
2	OBJETIVO.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Local dos experimentos.....	19
3.2	Meio de cultura.....	19
3.3	Desinfecção das orquídeas.....	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1	Eficiência de desinfecção.....	22
5	CONCLUSÃO.....	26
6	REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Produção de flores no Brasil

A história brasileira registra, desde seus primórdios, o importante papel que a flora nacional representa em sua economia. Na missiva de Pero Vaz de Caminha, dirigida ao rei Dom Manoel, é relatada a imponência da mata nativa e sua famosa expressão, referente à riqueza da terra: “em se plantando tudo dá” (OLIVEIRA; BRAINER, 2007; COUTO; ARAUJO; AGUILAR, 2021).

Neste sentido, a partir da década de 1950, a floricultura brasileira vem apresentando crescimento constante. O processo de urbanização acelerado na segunda metade do século XX, provocou a redução das chácaras e mansões, com grande parcela da população de renda mais elevada passando a residir em apartamentos. A impossibilidade de cultivar seus próprios jardins, levou à criação de um mercado consumidor, promovendo o desenvolvimento da produção de flores e plantas ornamentais em escala comercial (OLIVEIRA; BRAINER, 2007).

A produção de flores, face à biodiversidade existente e à amplitude de climas e solos do Brasil, possibilita cultivos bem diversificados, bem como a especificidade de produtos e mercado cativo, e isso constitui enorme potencial no agronegócio brasileiro. Quando se trabalha com flores, o objetivo imediato é atingir a emoção das pessoas, de forma positiva, uma vez que as flores sempre estão relacionadas com beleza e suavidade. Atualmente, o mercado interno de flores sofre concorrência de produtos alternativos como bolsas, perfumes e chocolates, num sinal evidente de que há necessidade de se estruturar mais profissionalmente. Embora existam barreiras e concorrentes, a potencialidade de “florir” o emocional do ser humano é enorme, desde que se trabalhe com criatividade nesse ramo do mercado (DOS SANTOS, 2011).

A atividade da produção de flores possibilita múltiplas formas de exploração e diversidade de cultivo que podem ser: produção de flores de corte, produção de flores e plantas envasadas, produção de folhagens, plantas de interior e viveiros de produção de mudas para jardins. Os produtos nacionais como flores tropicais, bromélias, orquídeas, entre outros, têm estimulado novos mercados, sendo bastante competitivos no mercado mundial (LANDGRAF; PAIVA, 2009).

Embora com pouca participação, em termos de área explorada pela agricultura intensiva, a atividade de produção de flores e plantas ornamentais representa importante alternativa econômica, devido as suas características de utilização de tecnologia avançada, proporcionando alto valor agregado e gerando numerosos empregos (OLIVEIRA; BRAINER, 2007).

A importância econômica da floricultura pode ser mensurada pelo volume de exportações dos principais agentes da cadeia global desse segmento: Em 2021 as cifras ultrapassaram US\$ 70 bilhões, mostrando grande crescimento ante US\$ 8,77 bilhões em 1999 (REIS; MARAFON, 2020). No Brasil, em 2020, foram comercializados R\$ 9,6 bilhões em flores.

O Brasil, embora não seja considerado um grande exportador de flores e plantas ornamentais, vem apresentando crescimento com esse agronegócio nas últimas décadas. Segundo informações expostas no estudo “Caracterização do setor produtivo de flores e plantas ornamentais no Brasil”, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), as mudanças evidenciadas estão inseridas na expansão do capitalismo internacional. Cabe ressaltar que o desenvolvimento do segmento de flores e plantas ornamentais teve grande contribuição dos imigrantes, principalmente holandeses e japoneses (REIS; MARAFON, 2020).

1.2 Orquídeas

As orquídeas estão entre as plantas mais evoluídas do planeta, no sentido de terem tido muito tempo para se aprimorarem. Elas surgiram, assim como os primatas, na última era geológica. Assim, as orquídeas estavam presentes na Terra cerca de 12 milhões de anos antes de Lucy, um dos ancestrais humanos mais antigos (CASTRO et al., 2017).

A beleza (Figura 1) e o perfume das flores das orquídeas têm exercido atração ao homem desde épocas remotas, e a sua família, a Orchidaceae, além de antiga é considerada a maior família botânica do mundo (SILVA et al. 2017).

Devido às características ornamentais, que são, principalmente, a beleza e a diversidade de formas e cores de suas flores, as orquídeas apresentam relevante importância econômica, por isso são retiradas excessivamente da natureza, o que levou inúmeras espécies à extinção (CAMARGO et al., 2015, SCHNITZER et al., 2015).

As orquídeas são encontradas em todos os continentes, com exceção das regiões desérticas, Ártico e Antártida. Ocorre mais significativamente nos trópicos, sendo o

Brasil a segunda maior concentração de espécies no planeta (MIYATA; VILLA; PASQUAL, 2014).

Figura 1. Exemplos de orquídeas do gênero *Cattleya*.



Fonte: De autoria própria.

No Brasil, a Mata Atlântica é o bioma mais rico em espécies de *Orchidaceae*, mas elas podem ser encontradas na Mata Atlântica de Pernambuco, no Cerrado, na Amazônia, e no litoral norte do Rio Grande do Sul. Além disso, as orquídeas foram encontradas nos

mais variados ambientes terrestres do litoral, ocorrendo em formações arenosas abertas, buritizais, em todas as formações florestais e em terrenos abertos cobertos (CASTRO et al., 2017).

Em MG a família *Orchidaceae* é uma das mais diversas e representativas do Cerrado. Por exemplo, das cinquenta espécies do gênero *Cyrtopodium* que são registradas no Continente Americano, cerca de trinta, dentre terrestres e epífitas, ocorrem no Cerrado (SILVA et al., 2017).

Os gêneros mais ricos em espécies de orquídea são: *Cattleya*, 108 espécies; *Catasetum*, com 67 espécies; *Pleurothallis* com 46 espécies; *Maxillaria* com 44 espécies; *Epidendrum* com 40 espécies; *Habenaria* com 33 espécies; e *Encyclia* com 20 (SILVA et al., 2017a), (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023).

De uma maneira geral, as orquídeas compartilham características exclusivas: são normalmente herbáceas (plantas de caule não lenhoso), epífitas (crescem sobre outros vegetais), terrestres, litófitas (vivem sobre solos rochosos ou apoiadas diretamente nas pedras), psamófitas (sobre a areia das praias) e saprófitas (obtêm os seus nutrientes a partir de tecidos, mortos e/ou em decomposição) (CASTRO et al., 2017).

Portanto, as orquídeas estão presentes em áreas tropicais, e utilizam-se das árvores somente como um aparato para obter certa luminosidade. Sendo assim, não são plantas parasitas, já que se nutrem através da água lixiviada e de materiais em decomposição caídos das árvores e que se depositam e acumulam junto às suas raízes (CASTRO et al., 2017).

O cultivo de orquídeas movimenta um mercado de números expressivos atualmente, sendo que plantas de determinadas espécies atingem alto valor, alcançando cifras da ordem de milhares de dólares por planta, como por exemplo: *Cattleya aclandiae* var. *alba* atingindo um valor de US\$ 2.000, ou algumas variedades de *Cattleya walkeriana* muito apreciada pelos japoneses e que podem atingir valores superiores a US\$ 5.000 (GALDIANO JÚNIOR et al., 2013).

1.3 A cultura de tecidos vegetais

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes e embriões somáticos apresenta muitas implicações práticas para o avanço dos

conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica, genética e produção de plantas. Essa grande capacidade de regeneração é possível graças a totipotência das células vegetais. Isso significa que as células são autônomas e têm potencialidade de regenerar plantas completas, desde que submetidas a tratamentos adequados. No entanto, a generalização do dogma da totipotencialidade, todavia, não tem sido facilmente demonstrada, conhecendo muitas espécies cuja capacidade regenerativa não foi ainda evidenciada na prática. Mesmo aceitando-se em princípio esse dogma, é bem conhecido o fato de certos tecidos, como os meristemas vegetais, serem mais favoráveis à regeneração de gemas, raízes e embriões somáticos do que outros. As diferenças celulares seriam estabelecidas e mantidas pelas influências mútuas das células e dos tecidos entre si (TORRES; CALDAS, 1998).

Para questões de nomeação da cultura de tecidos, qualquer parte separada da planta destinada ao uso *in vitro* denomina-se explante. A lista de possíveis explantes é longa e variada. A escolha do explante poderá ser influenciada por vários fatores, tais como: disponibilidade de material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido e estação do ano. Porém, nem todos os explantes reagem da mesma forma a uma determinada condição *in vitro* (BRASILEIRO; DURZAN, 2014).

A cultura de tecidos vegetais pode ser amplamente definida como um conjunto de métodos empregados para o crescimento de grande número de células em um meio estéril e controlado. Atualmente, o maior impacto da cultura de tecidos é observado na área da multiplicação vegetal, designada como micropropagação ou propagação clonal (RAVEN, 2014).

A micropropagação é uma alternativa que maximiza a propagação de várias espécies, tendo como vantagens a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade, em pequeno espaço físico e em curto período, independentemente de fatores climáticos limitantes (SOARES et al., 2010). Além da clonagem, a micropropagação proporciona uma maneira de evitar muitas doenças vegetais. Isso se deve, em parte, à desinfecção dos tecidos vegetais utilizados – os explantes – e às condições estéreis praticadas na micropropagação, principalmente, no uso de técnicas de cultura de meristema (tecido embrionário) e ápices caulinares (RAVEN, 2014).

Um fator que permitiu o surgimento da cultura de células e tecidos *in vitro* foi a descoberta dos hormônios e reguladores de crescimento vegetal, que promoveu grandes

avanços na área de fisiologia, principalmente no entendimento do controle da diferenciação celular (DE MELO, 2002).

Por definição, o hormônio vegetal ou fitormônio é uma substância química biologicamente ativa, produzida por uma planta que, em baixas concentrações (10^{-15} a 10^{-9} M) regula determinados processos fisiológicos, sendo em geral produzida em uma certa parte da planta e translocada para promover a ação em outra parte. As auxinas, giberelinas, citocinas, o ácido abscísico e o etileno são reconhecidos como hormônios vegetais (DE MELO, 2002).

Tanto nas plantas quanto nos animais, a regulação e a coordenação do metabolismo, do crescimento e da morfogênese dependem de sinais químicos, denominados hormônios. O termo “hormônio” provém do grego *horman*, que significa “estimular” (RAVEN, 2014).

Entre os mais importantes hormônios está a auxina, ou ácido indol 3-acético ou comumente nomeado AIA na cultura de tecidos. É encontrada principalmente nos meristemas dos ápices caulinares, folhas jovens e sementes em desenvolvimento, para diferenciação de tecidos vasculares, estimulação do desenvolvimento dos frutos (RAVEN, 2014).

Depois, as citocinas, derivadas da N⁶-adenina, são encontradas principalmente no ápice das raízes. Promovem a divisão celular, e a formação das gemas em culturas de tecidos (RAVEN, 2014). As citocinas podem ser naturais ou sintéticas, e a 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocina sintética mais usada na cultura de tecidos vegetais.

Há também o etileno, C₂H₄, que é produzido em resposta ao estresse, ou em tecidos em processo de senescência ou amadurecimento. Auxilia no processo de amadurecimento dos frutos, senescência de flores e folhas, abscisão de flores e frutos (RAVEN, 2014).

Entre os mais importantes está também o ácido abscísico, C₁₅H₂₀O₄, sintetizado em resposta ao estresse hídrico. Atua no fechamento de estômatos e dormência de sementes e gemas (RAVEN, 2014).

O crescimento e a morfogênese de plantas *in vitro* são regulados pela interação e pelo equilíbrio entre os fitorreguladores fornecidos no meio de cultura e o crescimento pelas substâncias produzidas endogenamente nas células das plantas cultivadas. A multiplicação *in vitro* de orquídea depende das combinações auxina/citocinina, de modo que o procedimento de regeneração em brotos deve ser otimizado para cada cultivar

trabalhada. No entanto, muito ainda precisa ser conhecido sobre os mecanismos de hormônios vegetais e sobre os processos que controlam o desenvolvimento das plantas (DE ANDRADE, 2002), (COUTO; ARAUJO; AGUILAR, 2021).

A propagação *in vitro* de plantas então pode ser feita de diversas formas, mas sempre leva as substâncias necessárias ao desenvolvimento embrionário e ao crescimento da planta. São as formulações Knudson C (1946), Vacin & Went (1949) e Murashige & Skoog “MS” (1962) as mais frequentemente utilizadas para o cultivo de orquídeas, por exemplo. Além de apresentarem os nutrientes essenciais, estes meios nutritivos tendem a ser suplementados com vitaminas, carboidrato, reguladores vegetais, carvão ativado, agentes gelificantes dentre outros compostos, de modo a atender as necessidades metabólicas e fisiológicas de cada espécie (VIANA, 2013).

A grande vantagem do meio MS é a presença de nitrogênio, sob a forma de nitrato de amônio. A forma como o nitrogênio é adicionado ao meio de cultura é determinante no sucesso da embriogênese somática, pois tem efeito estimulante. Um detalhe é que a quantidade de nitrogênio no meio é mais importante que a forma do íon (TORRES; CALDAS, 1998).

A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais usada para a embriogênese somática, embora outros mono e dissacarídeos possam ser utilizados. A concentração de sacarose influencia nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que seu metabolismo em plantas é regulado por um grupo de genes (sacarose sintase e sacarose invertase) cujas respostas são moduladas de acordo com a variação da sua concentração (TORRES; CALDAS, 1998).

O agente solidificante frequentemente utilizado é o ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas, que se mantém estável nas temperaturas de cultura e não é assimilado por enzimas presentes no explante (MENEZES-SÁ et al., 2022).

Adentrando mais em um dos produtos adicionados aos meios de cultura, o carvão ativado, pode-se dizer que promove alguns efeitos benéficos como melhores condições no desenvolvimento de embriões e maior crescimento de raízes. Isso se atribui à presença de uma excelente rede de poros com grande superfície interna na estrutura do carvão ativado, em que muitas substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes podem permanecer adsorvidos (SCHNEIDERS et al., 2012).

Assim, diversos meios de cultivo podem ser empregados para propagação *in vitro* de plantas, como as orquídeas, mas todos possuindo basicamente o mesmo padrão. O meio de cultura mais utilizado, porém, não o mais adequado, é o MS (MURASHIGE;

SKOOG, 1962), composto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, Fe-EDTA, sacarose e ágar, acrescido de carvão ativado (MIYATA; VILLA; PASQUAL, 2014).

Não existe, ainda, um meio de cultura específico adequado para um gênero, espécie, híbrido ou clone de orquídea. Em geral, é difícil explicar por que em certas combinações de componentes do meio e condições de cultivo os resultados têm sido bem sucedidos, enquanto em outras não se tem logrado êxito (MIYATA; VILLA; PASQUAL, 2014).

1.4 A cultura de tecidos de orquídeas *Cattleya*

Em condições naturais, a propagação de orquídeas se dá pela proliferação de mudas laterais (brotações) ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. Um fator que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições naturais é a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas, que são fungos localizados nas raízes das plantas. Eles fornecem açúcares que possibilitam a germinação da semente, que não germinariam sozinhas por não terem o endosperma. Naturalmente, ocorre a deiscência das cápsulas, e as sementes são lançadas no ambiente e, ao entrarem em contato com as micorrizas nas raízes das plantas adultas da mesma espécie, se associam e germinam (SOARES et al., 2010).

Portanto, as sementes, embora produzidas em grande quantidade, não possuem endosperma funcional, sendo incapazes de germinar e tornarem-se adultas sem que haja a associação de fungos micorrízicos (MIYATA; VILLA; PASQUAL, 2014).

O cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido excelente alternativa a ser empregada para a propagação das orquídeas, pois apresenta vantagens únicas sobre os métodos convencionais de propagação, como multiplicação rápida e obtenção de grande número de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária (FIGUEIREDO et al., 2008).

Recentemente, as técnicas de cultivo *in vitro* têm sido utilizadas para a propagação de orquídeas, para o estudo de aspectos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento e como método de conservação *ex-situ* para redução do risco de extinção (SCHNEIDERS et al., 2012).

Sobre o cultivo *in vitro* de *Cattleya*, à estudos que indicam que o extrato pirolenhoso (obtido, no processo de carbonização da madeira ou do bambu para a produção do carvão), é eficaz para o cultivo de *Cattleya loddigesii* Lindl. A dose de

extrato pirolenhoso recomendada para a espécie *Cattleya loddigesii* Lindl. é de 0,6% (6 mL/L) (SCHNITZER et al., 2015).

Em um segundo estudo, percebe-se que *Cattleya forbesii* e *C. harrisonina* desenvolvem-se mais rapidamente em meio básico de Murashige & Skoog (MS), ou seja, com força total de macro e micronutrientes e 2,5 g L/L de carvão ativado (SCHNEIDERS et al., 2012).

Em um terceiro estudo, a combinação de KCl com K₂SO₄, ambos na concentração de 500mg/L, promoveu maior crescimento *in vitro* em plantas de *Cattleya loddigesii* (FIGUEIREDO et al., 2008).

Através da cultura de tecidos, também é possível induzir a duplicação cromossômica em plantas, podendo proporcionar um aumento em tamanho das estruturas vegetativas ("gigantismo"), e beneficiar assim a orquicultura, uma vez que resulta em flores de maior valor comercial, normalmente de maior tamanho, com conformação mais redonda e maior conteúdo de substâncias que intensificam a cor e fragrância, quando comparadas com as orquídeas diploides (MENEZES-SÁ et al., 2022).

Na cultura de tecidos, tanto da *Cattleya* quanto das outras espécies de plantas, a contaminação frequentemente ocorre, mesmo com todos os procedimentos do laboratório sendo feitos adequadamente. A maioria dos fungos e leveduras contaminantes pode ser facilmente visualizada pelo exame macroscópico dos tecidos vegetais infectados. As características de esporo/micélio podem ser usadas para identificar o gênero de fungos/leveduras associado à fonte de contaminação específica. Também é possível separar as leveduras das bactérias contaminantes por meio da avaliação macroscópica. Leveduras crescem vigorosamente e formam colônias esbranquiçadas ou vermelhas/rosas, produzindo um odor típico de levedura no frasco de cultura, enquanto que as bactérias usualmente apresentam um crescimento mais leve no meio de cultura ou, quando crescem mais vigorosamente, as colônias são de aparência fina e translúcida (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

1.5 Microrganismos endofíticos

Endófitos são todos os organismos que habitam os órgãos das plantas que em algum momento de sua vida, podem colonizar os tecidos internos da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

Porém, patogenicidade e o mutualismo podem estar muito próximos, e o mesmo organismo pode alternar entre esses estilos de vida dependendo das condições ambientais (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

Esses microorganismos endofíticos são uma fonte de contaminação da micropropagação *in vitro*, e são de particular preocupação porque podem sobreviver à superfície de esterilização e boas práticas de cultura (ROMADANOVA et al., 2022).

Bactérias endofíticas são comuns e foram detectadas em praticamente todos os tecidos vegetais, incluindo a raiz, caule, folhas, tecidos meristemáticos, flores, sementes e frutos (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

Dentre os microorganismos endofíticos, endófitos bacterianos são, em comparação com os fúngicos, muito menos estudados (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

Alguns endófitos, chamados comensais, não têm nenhum efeito aparente na planta, mas apenas vivem nos metabolitos produzidos pelo seu hospedeiro. O segundo grupo confere um efeito benéfico na planta, seja na forma de um crescimento da planta ou proteção contra patógenos invasores. Um terceiro grupo consiste em patógenos latentes que persistem no tecido vegetal até que as condições sejam favoráveis para uma infecção sistêmica e desenvolvimento de doença (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

A contaminação por endófitos causa perdas de cultura e afeta diretamente a eficiência de protocolos de micropropagação. Apesar dos mais rigorosos usos de técnicas estéreis e condições assépticas, contaminação de culturas de células e tecidos vegetais continua a ser um problema (ROMADANOVA et al., 2022), (THOMAS; AGRAWAL; BHARATHKUMAR, 2017).

Embora as bactérias endofíticas permaneçam uma ameaça contínua à cultura de tecidos vegetais, técnicas para controlar e, em alguns casos, eliminar a contaminação estão disponíveis (ROMADANOVA et al., 2022).

O PPM (Plant Preservative Mixture), é um conservante e biocida relativamente novo e de amplo espectro para uso em cultura de tecidos vegetais cujos ingredientes ativos são 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona e 2-metil-3(2H)-isotiazolona. O PPM tem se mostrado eficaz na prevenção da contaminação microbiana. A erradicação eficaz de microorganismos endofíticos com o uso do PPM ampliou sua finalidade de uso oferecendo a viabilidade de até mesmo limpar o contaminado de culturas de tecidos vegetais. PPM é recomendado para uso no início da cultura para verificar os contaminantes microbianos

endógenos, submetendo os explantes para diferentes concentrações ou durações (THOMAS; AGRAWAL; BHARATHKUMAR, 2017).

Além do PPM, também como do protocolo de desinfecção, e durante o início da cultura *in vitro*, explantes de vários tipos são submetidos à desinfecção de superfícies, sendo mais comumente empregando cloro na forma de hipoclorito de sódio (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

É importante mencionar que há um análogo do PPM chamado Kathon. Ele contém a mesma formulação, mas é aproximadamente 8 vezes mais concentrado. O conservante Kathon exibe excelente atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e bolores. A contaminação microbiana pode afetar o aparência, odor e desempenho dos produtos, e isso inclui o cultivo *in vitro* de orquídeas. O Kathon exibe atividade de amplo espectro, excelente compatibilidade físico-química e baixa toxicidade em níveis de uso recomendados fornecem uma solução econômica, eficaz e ambientalmente aceitável alternativa a outros conservantes comerciais (ROHM AND HAAS, 2007).

2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi estabelecer as condições de desinfecção para cultivo *in vitro* de orquídeas do gênero *Cattleya*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos e material utilizado

Os experimentos foram feitos no laboratório Jardim com flores, e lá estavam disponíveis os seguintes equipamentos: autoclave (Phoenix), balança de precisão (SZW), PHmetro (AKSO), micropipeta, geladeira, sala de cultivo e estufa.

3.2 Meio de cultura

O meio utilizado no cultivo das orquídeas foi o meio MS/2 (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que é o comumente utilizado para cultura de tecidos, com a diferença que nesse trabalho sua quantidade é dividida por dois, visto que orquídea e

consequentemente seu broto e seus tecidos meristemáticos precisam de menos nutrientes comparado a outras plantas (um exemplo é quando ela pega os nutrientes lixiviados das árvores) suplementado com compostos adicionais (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do meio de cultura para orquídeas

Reagentes	Concentração
Meio MS	2,2g/L
Ácido Ascórbico	0,250g/L
Carvão Ativado	2,5g/L
Sacarose	30g/L
Ágar	6g/L
Kathon CG	0,5ml/L
BAP (6-benzilaminopurina)	6mg/L
ANA (ácido naftaleno acético)	1mg/L
Água autoclavada	1L
Orquídeas	4 brotos sendo 12 meristemas

3.3 Desinfecção das orquídeas

A desinfecção foi realizada em três tecidos diferentes: O broto inteiro, meristemas isolados e meristemas com tecidos circundantes.

Os brotos (Figura 2A) foram desinfectados com os seguintes passos: Foram coletados na casa de vegetação, limpos com etanol 70% e um algodão, imersos em etanol 70% por um minuto, lavados em água estéril, imersos em hipoclorito de sódio 0,75% por 12, 15, e 20 minutos e, ao final, os brotos foram lavados 3 vezes com água estéril. Usando pinça e bisturi, foi feita a excisão dos meristemas e esses foram inoculados no meio de cultura. De cada broto foi possível obter 3 meristemas.

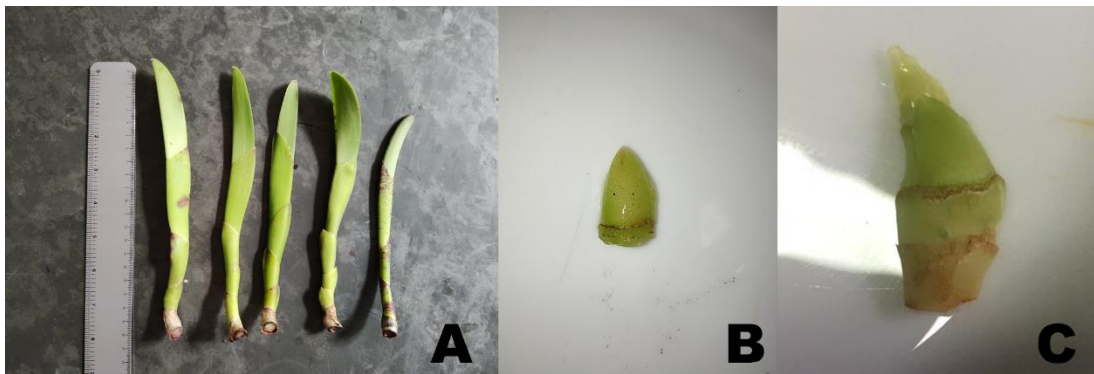
A desinfecção também foi feita usando os meristemas já extraídos (Figura 2B). Essa desinfecção foi feita de duas formas, uma com o agente principal sendo o hipoclorito, e outra com o agente principal sendo o Kathon. Os brotos foram coletados na casa de vegetação, limpos com etanol 70% e algodão, seguido da excisão dos meristemas usando pinça e bisturi. Antes da desinfecção, os meristemas foram deixados imersos em uma solução antioxidante. Essa solução foi composta de 0,5 ml/L de Kathon e 0,25g/L de ácido ascórbico e foi esterilizada em autoclave. Essa solução foi usada com objetivo de evitar a oxidação prematura dos meristemas. Após a excisão, os meristemas foram inoculados em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e por diferentes tempos: 0,25% por 15 minutos, 0,5% por 25 minutos e 0,75% por 30 minutos. Após a

desinfecção os meristemas foram lavados 3 vezes com água estéril por 5 minutos cada, e em seguida foram inoculados no meio de cultura MS/2.

Os meristemas também foram desinfetados usando apenas Kathon em concentrações elevadas. Os brotos foram coletados na casa de vegetação, limpos com etanol 70% e algodão, seguido da excisão dos meristemas usando pinça e bisturi. Em seguida os meristemas foram imersos em uma solução de desinfecção, contendo 4,4 g/L de MS/2, 0,4g/L de ácido ascórbico, 8ml/L Kathon (0,8%). Os meristemas ficaram submersos nessa solução por 6 horas em agitação de 100 rpm. Em seguida foram inoculados em meio de cultura.

A desinfecção foi feita, também, com o meristema e os tecidos circundantes (Figura 2C), usando hipoclorito e kathon. Os brotos foram coletados na casa de vegetação, limpos com etanol 70% e algodão, seguido da excisão dos meristemas e tecidos circundantes usando pinça e bisturi. Antes da desinfecção, os meristemas foram deixados imersos em uma solução antioxidante. Essa solução foi composta por 0,5 ml/L de Kathon e 0,25g/L de ácido ascórbico e foi esterilizada em autoclave. Após a excisão, os meristemas com tecidos circundantes foram inoculados em duas concentrações diferentes de hipoclorito de sódio por 30 minutos: 0,375% e 0,5%. Após a desinfecção, os meristemas foram lavados 3 vezes com água estéril por 5 minutos cada, e em seguida foram inoculados no meio de cultura MS. Os meristemas foram desinfetados também em Kathon 0,7% por 60 minutos, sem lavagem com água estéril.

Figura 2. Tecidos usados na desinfecção. A: broto, B: Meristema e C: meristema com tecidos circundantes.



Fonte: De autoria própria.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eficiência de desinfecção

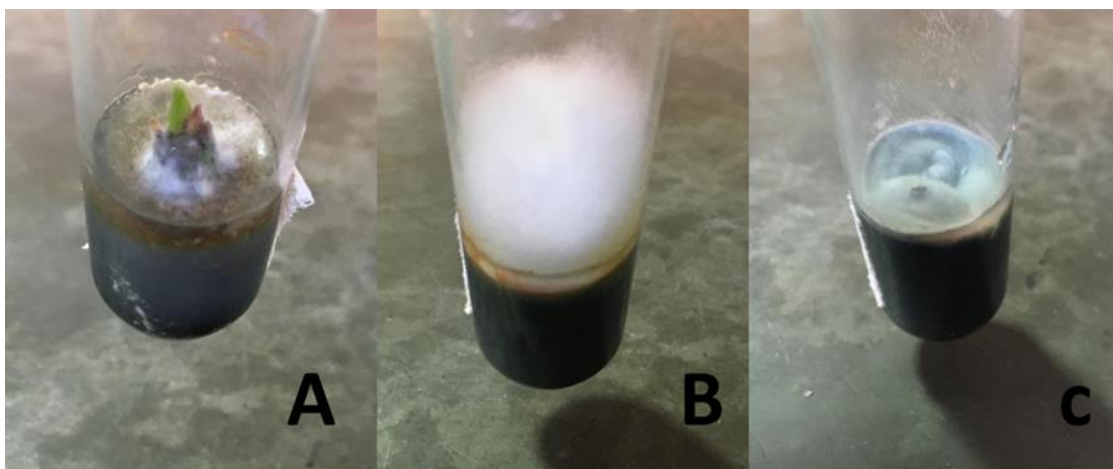
A cultura de tecidos é um método avançado para o cultivo de plantas e já foi aplicada em muitas espécies, incluindo diversas espécies de orquídeas (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015). Evitar a contaminação na cultura de tecidos vegetais é muito importante para o sucesso do procedimento de cultivo. Esterilizar externamente um tecido vegetal é relativamente simples, contudo, a existência de microrganismos endofíticos pode dificultar em muito a cultura de tecidos vegetais provocando perdas e reduzindo a eficiência dos protocolos (ROMADANOVA et al., 2022). Por isso, está justificada a importância desse trabalho, que visa a desinfecção dos tecidos meristemáticos de orquídea.

No meio de cultura MS/2 foram adicionados diversos compostos e cada um teve a sua função. Foi adicionado ácido ascórbico e carvão ativado para controlar a oxidação dos tecidos, e o carvão tem poros que mantem substâncias tóxicas ao meio adsorvidas, a sacarose como fonte de energia, o ágar, um polissacarídeo extraído das algas marinhas que em temperatura ambiente se solidifica, gelificando o meio e sendo inerte às outras substâncias, Kathon CG, um conservante bactericida e fungicida, para evitar contaminação e os hormônios BAP e ANA para induzir o crescimento dos tecidos. Vale

ressaltar que o sucesso desse trabalho dependeu de outros itens além dos que compõe o meio, como solução antioxidante, solução desinfectante, e os métodos já detalhados.

As metodologias de desinfecção avaliadas tiveram diferentes eficácias. A desinfecção feita diretamente nos brotos (Figura 2A) não foi eficiente e 100% dos meristemas apresentaram contaminação com fungos ou bactérias e/ou oxidação após 7 dias. Esse padrão de contaminação indica a presença de microrganismos endofíticos nos tecidos coletados (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Contaminações do tecido por fungos.



Fonte: De autoria própria.

Figura 4. Meristema oxidado e contaminado por bactéria.



Fonte: De autoria própria.

A presença de microrganismos endofíticos já foi relatada em espécies de *Cattleya* (FARIA et al., 2013). Outro problema que ocorreu na desinfecção a partir de brotos foi a rápida oxidação dos meristemas após a excisão usando bisturi. O tecido começava a oxidar logo após o corte indicando a necessidade do uso de algum composto antioxidante.

Objetivando resolver os problemas de contaminação e oxidação, a desinfecção passou a ser feita diretamente no meristema (Figura 2B), usando hipoclorito de sódio em diferentes concentrações ou o Kathon. A desinfecção diretamente do meristema visou reduzir o tamanho do tecido para aumentar a penetração do agente desinfectante. A taxa de contaminação foi reduzida com a alteração do tecido, pois o meristema, e não mais o broto na sua totalidade, foi mais exposto ao hipoclorito ou o kathon (Tabela 2) e quanto maior o tempo de exposição, maior a desinfecção, porém maior também a oxidação.

O uso da solução antioxidante foi eficaz em impedir a oxidação durante o procedimento de desinfecção. Sem a solução antioxidante os meristemas oxidavam quando excisados. Contudo, isso não impediu a oxidação ao longo do tempo (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de contaminação, oxidação e viabilidade dos meristemas obtidos dos brotos de *cattleya* após diferentes tratamentos com hipoclorito de sódio e Kathon.

Tratamento	%viáveis	%contaminação	%oxidação
0,25% hipoclorito de sódio por 15 minutos	0%	57 %	43%
0,5% hipoclorito de sódio por 25 minutos	0%	60 %	40%
0,75% hipoclorito de sódio por 30 minutos	0%	25 %	75%
Kathon 0,8% por 6 horas.	0%	0%	100%

Quanto a desinfecção, apesar de ter sido alcançada com hipoclorito de sódio, os meristemas continuaram oxidando após alguns dias de cultivo, provavelmente devido à fragilidade dos meristemas de *Cattleya*. Neste sentido, outra tentativa de desinfecção foi feita usando o meristema com tecidos circundantes (Figura 2C), com objetivo de aumentar o tamanho do tecido e reduzir assim, a oxidação. Os resultados dessa desinfecção foram melhores, alcançando uma elevada porcentagem de viabilidade, que é quando os meristemas estão em sua totalidade ou quase totalmente verdes e sem contaminação. Usando este tecido, a condição de descontaminação em que foi obtido o melhor resultado foi usando 0,5% de hipoclorito por 30 minutos, onde 71% dos meristemas se mantiveram viáveis (Tabela 3) (Figura 5).

Esse resultado, o mais importante e que mais obteve sucesso frente ao objetivo, disponibiliza informações que podem ser referência para outras pesquisas que visam

desinfetar meristemas, e assim controlar e até eliminar as contaminações endofíticas. Assim, pesquisas e trabalhos com esse tecido podem já utilizar meristemas cobertos de tecidos circundantes, uma vez provada a fragilidade do meristema sozinho, que nesse caso foi de orquídeas, mas que com outras plantas pode mostrar semelhante padrão. O tempo de inoculação no hipoclorito que está nesse resultado é também muito importante para trabalhos posteriores, pois foram testados diversos tempos e diversas concentrações.

Figura 5. Meristema viável.



Fonte: De autoria própria.

Tabela 3. Percentual de contaminação, oxidação e viabilidade dos meristemas e tecidos circundantes de *Cattleya* após diferentes tratamentos com hipoclorito de sódio e Kathon.

Tratamento	%viáveis	% contaminação	% oxidação
0,375% hipoclorito de sódio por 30 minutos	41%	33%	26%
0,5% hipoclorito de sódio por 30 minutos	71,5%	0%	28,5%
Kathon 0,7% por 60 minutos.	37,5%	12,5%	50%

Dentre os compostos usados para atingir o objetivo de eliminar contaminação endofítica, existe o PPM (Plant Preservative Mixture) usado no início das tentativas. O PPM já foi usado com sucesso para evitar a contaminação por microrganismos endofíticos em cultura *in vitro* de maçã, (ROMADANOVA et al., 2022). Contudo, o PPM não foi capaz de controlar o crescimento de microrganismos endofíticos em cultivo *in vitro* de mamão (THOMAS; AGRAWAL; BHARATHKUMAR, 2017), e assim nota-se a relatividade da eficácia da desinfecção, dependendo da planta.

Neste trabalho foi usado de forma definitiva o Kathon, composto conservante, bactericida e fungicida, para controlar o crescimento microbiano no meio de cultura e

como agente descontaminante dos meristemas. O Kathon possui a mesma composição do PPM, só que 8 vezes mais concentrado (ROHM AND HAAS, 2007). O Kathon conseguiu desinfetar totalmente os meristemas, porém provocou a oxidação de 100% deles (Tabela 2).

É válido destacar que o meio utilizado não foi capaz de induzir a micropropagação de *Cattleya* durante o tempo de cultivo disponível, pois depende da viabilidade prévia dos meristemas.

5 CONCLUSÃO

Analisando os resultados, foi possível concluir que método que mostrou melhor eficácia na desinfecção de meristemas de *Cattleya*, foi o que usou o meristema mais tecidos circundantes, descontaminado com 0,5% de hipoclorito de sódio por 30 minutos. Experimentos adicionais serão necessários para definir a composição mais adequada de fitorreguladores de crescimento que induza a micropropagação de meristemas de *Cattleya*.

6 REFERÊNCIAS

BRASILEIRO, A. C. M.; DURZAN, D. J. **Cultivo in vitro de plantas**. 4ª edição ed. [s.l: s.n.].

CAMARGO, S. S. et al. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2007–2012, nov. 2015.

CASTRO, P. R. DE C. E et al. (EDS.). **Orquídeas**. [s.l.] Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2020.

COUTO, T. R. DO; ARAUJO, J. S. DE P.; AGUILAR, J. P. DE L. Balanço hormonal auxina/citocinica para multiplicação in vitro de genótipos de gérbera. **Revista Agraria Academica**, v. 4, n. 1, p. 119–134, 1 jan. 2021.

DE ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. 1ª edição ed. [s.l: s.n.].

DE MEIO, N. F. Introdução aos Hormônios e Reguladores de Crescimento Vegetal. 2002.

DOS SANTOS, ET AL D. P. C. O Complexo Agroindustrial das Flores do Brasil e suas peculiaridades. 2011.

FARIA, D. C. et al. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 217–221, 27 fev. 2013.

FIGUEIREDO, M. A. DE et al. Fontes de potássio no crescimento in vitro de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 255–257, fev. 2008.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. et al. Desenvolvimento inicial e crescimento in vitro de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 127–134, jun. 2013.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. DE O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 120–126, fev. 2009.

MENEZES-SÁ, T. S. A. et al. In vitro propagation and conservation of *Cattleya tigrina* A. Rich. **Ciência Rural**, v. 52, n. 5, 2022.

MIYATA, L. Y.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meios de cultura utilizados na micropropagação de híbridos de orquídeas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1731, 27 ago. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27 abr. 2023.

OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. DE C. P. **Floricultura: caracterização e mercado**. [s.l.: s.n.].

QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. Em: [s.l.: s.n.]. p. 69–88.

RAVEN. **Biologia vegetal**. 8ª ed. [s.l.: s.n.].

REIS, J. L. C. DA S.; MARAFON, G. J. A DIMENSÃO ESPACIAL DA REDE DE FLORES E PLANTAS ORNAMENTAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: UMA ANÁLISE A PARTIR DO MUNICÍPIO DE NOVA FRIBURGO, ENTRE OS ANOS DE 2002 E 2018. **Geo UERJ**, n. 36, p. e47278, 14 fev. 2020.

ROHM AND HAAS. **KATHON™ CG/ICP KATHON™ CG/ICP II Highly Effective Preservatives for Use in Household and Industrial Products**. [s.l.: s.n.].

ROMADANOVA, N. V. et al. Effect of Plant Preservative Mixture™ on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown Apple Shoots. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2624, 5 out. 2022.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 2 ed. ed. Brasília, DF : [s.n.].

SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185–191, abr. 2012a.

SCHNEIDERS, D. et al. Germinação, crescimento e desenvolvimento in vitro de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p. 185–191, abr. 2012b.

SCHNITZER, J. A. et al. Doses de extrato pirolenhoso no cultivo de orquídea. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 101–106, fev. 2015.

SOARES, J. D. R. et al. Estiolamento e luz artificial no cultivo in vitro de orquídeas nativa e híbrida. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1941–1947, 17 set. 2010.

SOUSA, K. C. I. et al. Germinação e desenvolvimento in vitro de orquídea epífita do Cerrado. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 1, p. 96, 22 mar. 2017a.

SOUSA, K. C. I. et al. Germinação e desenvolvimento in vitro de orquídea epífita do Cerrado. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 1, p. 96, jun. 2017b.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. et al. Dendrobium micropropagation: a review. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 5, p. 671–704, 19 maio 2015.

THOMAS, P.; AGRAWAL, M.; BHARATHKUMAR, C. B. Use of Plant Preservative Mixture™ for establishing in vitro cultures from field plants: Experience with papaya reveals several PPM™ tolerant endophytic bacteria. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 11, p. 1717–1730, 26 nov. 2017.

TORRES, A.; CALDAS, L. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília DF: [s.n.]. v. 2

VIANA, C. PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO in vitro DE *Cattleya elongata* BARB. RODR. (ORCHIDACEAE JUSS.) . 2013.