

Avaliação da fitotoxicidade de fungicidas e germicida na propagação *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae) para o controle de microorganismos

Fungicide and germicide on contamination escaping in the *in vitro* propagation of *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae)

Melissa Lombardi Oda¹; Ricardo Tadeu de Faria^{2*};
Inês Cristina Batista Fonseca²; Geraldo Lopes Silva³

Resumo

Um dos maiores problemas na produção de mudas *in vitro*, é a contaminação por fungos e bactérias do meio de cultura durante as etapas de micropropagação, mesmo havendo todos os cuidados de assepsia. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de fungicidas e germicida no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* da orquídea *Oncidium varicosum* Lindl. As flores foram polinizadas artificialmente e as sementes foram germinadas no meio MS modificado com a metade da concentração dos macronutrientes. As plântulas obtidas foram subcultivadas no mesmo meio de germinação, adicionando-se os fungicidas azoxystrobin, benomyl, chlorothalonil nas concentrações: 0,1 g.L⁻¹; 0,2 g.L⁻¹; 0,4 g.L⁻¹; 0,6 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹. O germicida hipoclorito de sódio com 10% de cloro ativo foi adicionado ao meio nutritivo nas concentrações: 0,5 mL.L⁻¹; 0,75 mL.L⁻¹; 1,00 mL.L⁻¹; 1,25 mL.L⁻¹ e 1,50 mL.L⁻¹. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento e cinco plântulas por frasco. O tratamento contendo hipoclorito de sódio 1,5 mL.L⁻¹ mostrou-se o menos tóxico, pois não afetou o desenvolvimento vegetativo e o enraizamento *in vitro* de plântulas de *Oncidium varicosum*.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, meio de cultura, orquídea, fungos, bactérias.

Abstract

Contamination of the culture medium during the micropropagation stages is a serious problem for the seedling *in vitro* production. This study was carried out to investigate the effect of fungicides and germicide on the plant growth and rooting, degree of phytotoxicity and control of contamination during *in vitro* cultivation of *O. varicosum* orchid. The flowers were pollinated artificially and the capsules seeds were sowed in MS culture medium modified with half of the macronutrients. The seedlings were transferred to the same culture medium used for germination, added with the fungicides azoxystrobin, benomyl, chlorothalonil (0 g.L⁻¹, 0.1 g.L⁻¹; 0.2 g.L⁻¹; 0.4 g.L⁻¹; 0.6 g.L⁻¹ and 0.8 g.L⁻¹) or sodium hypochloride with 10% active chloride (0 mL.L⁻¹, 0.5 mL.L⁻¹; 0.75 mL.L⁻¹; 1.00 mL.L⁻¹; 1.25 mL.L⁻¹; 1.50 mL.L⁻¹). A complete randomized block design was used with ten replications per treatment and five plantlets per flask. The treatment containing 1.5 mL.L⁻¹ sodium hypochloride was the best in preventing contamination by microorganisms and did not cause any apparent harm on development and rooting of *Oncidium varicosum* plantlets grown *in vitro*.

Key words: Tissue culture, culture medium, orchid, fungi, bacteria.

¹ Estudante de Graduação da Universidade Estadual de Londrina

² Professor Doutor, Departamento de Agronomia – Caixa Postal: 6001- 86051-990 . Londrina(PR). E-mail: faria@uel.br

³ Técnico de Laboratório

* Autor para correspondência.

Introdução

A possibilidade de propagar orquídeas por técnicas *in vitro* representou um grande impacto sobre o seu cultivo, e as técnicas de cultura de tecidos são muito utilizadas para propagação destas espécies (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

A clonagem de orquídeas tem sido realizada por várias biofábricas, utilizando como explantes, principalmente, gemas axilares e ápices caulinares, porém foi observado a regeneração de plantas de *Oncidium varicosum* de calos formados a partir de ápices radiculares, após noventa dias de cultura (KERBAUY, 1984).

Um dos maiores problemas da produção industrial de mudas, é a porcentagem de contaminação por fungos e bactérias que ocorrem durante as etapas de subcultivo na propagação em laboratório mesmo utilizando a câmara de fluxo laminar. É difícil se obter informações precisas sobre a frequência de perdas devido a contaminação, que podem variar de 5% a 10%, mas as biofábricas de plantas reconhecem a seriedade do problema (WRIGHT, 1986).

A contaminação em cultura de tecidos pode originar-se a partir de microorganismos encontrados no ar, no tecido de explantes, ou por procedimentos inadequados no laboratório (DEBERGH; ZIMMERMAN, 1993). O mais sério problema de contaminação é originário por fungos e bactérias (LEIFERT; WAITES, 1990).

Grattapaglia e Machado (1990), trabalharam com várias espécies vegetais adicionaram ao meio nutritivo 50 mg.L⁻¹ de benomyl e concluíram que a contaminação com o fungo do gênero *Penicillium* foi controlada.

As contaminações por fungos e bactérias podem causar perdas econômicas para o micropropagador, infestando o meio de cultura e levando as plantas à morte (LONG; CURTIN; CASSELS, 1988). Este problema é exacerbado quando o contaminante não é observado durante as primeiras fases da propagação, mas apenas é notado durante a

produção; comprometendo-se assim a multiplicação *in vitro* (LEIFERT et al., 1989).

Vários estudos avaliando o uso e efeitos de agentes bactericidas na cultura de tecidos *in vitro*, e a adição de antibióticos no meio de cultura tem sido sugeridos como uma estratégia para combater a proliferação de bactérias (FALKINER, 1990). Em contraste, poucas publicações descrevem a prevenção da contaminação utilizando fungicidas no meio nutritivo e o seu efeito sobre as plântulas no cultivo *in vitro* (SHIELDS; ROBINSON; ANSLOW, 1984).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito tóxico de substâncias fungicidas e germicidas, no crescimento vegetativo e enraizamento de plântulas da orquídea *Oncidium varicosum* durante a propagação *in vitro*.

Material e Métodos

As flores de *Oncidium varicosum* foram polinizadas artificialmente na casa de vegetação, visando a produção de sementes. As sementes, foram coletadas após nove meses da polinização e submetidas a agente bactericida, hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo) 33% v/v por 15 minutos, para desinfestação superficial e germinadas *in vitro* no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), modificado, contendo a metade da concentração dos macronutrientes e pH 6,0. Nove meses após a semeadura as plântulas com altura de parte aérea 2,0±0,4 cm foram inoculadas no meio de cultura MS semi-sólido e os fungicidas azoxystrobin (Amistar 500WG), benomyl (Benlate 500) e chlorothalonil (Daconil BR – 75% i.a) foram adicionados nas concentrações: 0 g.L⁻¹, 0,1 g.L⁻¹, 0,2 g.L⁻¹, 0,4 g.L⁻¹, 0,6 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹. O germicida hipoclorito de sódio (10% cloro ativo) foi adicionado nas concentrações de: 0 mL.L⁻¹, 0,50 mL.L⁻¹, 0,75 mL.L⁻¹, 1,0 mL.L⁻¹, 1,25 mL.L⁻¹ e 1,50 mL.L⁻¹.

Em cada frasco foram distribuídos 50 mL de meio nutritivo contendo os diferentes tratamentos. Os

frascos foram autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1 atm. Os frascos contendo as plântulas foram fechados com tampas plásticas, complementando a vedação dos mesmos com filme de PVC e mantidos em uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas-luz e temperatura aproximadamente de 25°C.

Após 120 dias do início do experimento realizou-se a avaliação da altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e peso fresco.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e cinco plântulas por frasco. Para as variáveis altura da parte aérea, comprimento da maior

raiz, número de raízes e peso fresco, aplicou-se a análise de variância e o teste de médias de Tukey a 5%.

Resultados e Discussão

Nenhum sinal de fitotoxicidade foi constatado nos tratamentos em que foram utilizados chlorothalonil e o germicida hipoclorito de sódio em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1).

Os resultados de altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e peso fresco, nos diferentes tratamentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Médias de altura de plantas, comprimento da maior raiz, número de raízes, e peso fresco, aos 120 dias de plântulas de *Oncidium varicosum* propagadas *in vitro*.

Tratamentos	Dose	Altura das plântulas (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)	Número de raízes ²	Peso fresco (mg)
Testemunha		2,83 ABC ¹	1,75 ABC	2,41 BCD	0,41 B
Benomyl	0,1 g.L ⁻¹	2,65 ABC	1,25 C	1,73 CD	0,19 CD
	0,2 g.L ⁻¹	2,39 BC	1,26 C	1,46 D	0,17 D
	0,4 g.L ⁻¹	2,76 ABC	1,34 C	1,66 CD	0,25 CD
	0,6 g.L ⁻¹	3,03 ABC	2,08 ABC	2,20 BCD	0,35 BCD
	0,8 g.L ⁻¹	-	-	-	-
Chlorothalonil	0,1 g.L ⁻¹	2,53 ABC	1,70 ABC	2,00 BCD	0,20 CD
	0,2 g.L ⁻¹	2,23 BC	1,17 C	1,86 BCD	0,21 CD
	0,4 g.L ⁻¹	2,39 BC	1,91 ABC	2,00 BCD	0,23 CD
	0,6 g.L ⁻¹	2,76 ABC	1,46 ABC	2,13 BCD	0,20 CD
	0,8 g.L ⁻¹	2,13 C	1,80 ABC	2,46 BCD	0,23 CD
Azoxystrobin ³	-	-	-	-	-
Hipoclorito de sódio (10% cloro ativo)	0,5 mL.L ⁻¹	3,73 ABC	2,20 ABC	4,83 AB	0,54 ABC
	0,75mL.L ⁻¹	3,87 AB	1,87 ABC	3,83 ABCD	0,53 ABCD
	1,00mL.L ⁻¹	3,39 ABC	1,44 ABC	4,33 ABC	0,48 ABCD
	1,25mL.L ⁻¹	4,19 A	2,64 AB	3,77 ABCD	0,70 AB
	1,50mL.L ⁻¹	3,75 ABC	2,72 A	5,83 A	0,79 A
CV%		22,67	42,70	19,11	40,03
D.M.S.		1,67	1,34	2,91	0,35

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

² Dados transformados em raiz quadrada.

³ O azoxystrobin foi letal em todas as doses avaliadas.

Verificou-se que todas as concentrações de azoxystrobin e a alta dose de benomyl (0,8 g.L⁻¹) foram letais para as plântulas. Analisando-se os dados do número de raízes e comprimento da maior raiz foi observado uma redução em todos estes parâmetros à medida que aumentou-se a dosagem do fungicida benomyl. Em trabalhos realizados previamente, constatou-se que doses de benomyl (1,00 g.L⁻¹) e chlorothalonil (2,00 g.L⁻¹) foram letais para as plântulas de orquídea propagadas *in vitro* (dados não publicados).

Watt, Blakeway e Gauntlett (1996) constataram em seu estudo com *Eucalyptus grandis*, que tanto benomyl (0,5 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹) e chlorothalonil (0,25 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹) adicionados no meio de cultura foram prejudiciais, no cultivo *in vitro* dessa planta. Esses autores observaram que a sobrevivência dos explantes foi afetada significativamente sendo a multiplicação e regeneração da planta completamente inibidas.

A adição de substâncias germicidas e fungicidas no meio nutritivo, em concentrações não tóxicas ao explante, irá auxiliar na prevenção e controle da contaminação por microorganismos durante a fase do estabelecimento da cultura estéril.

Conclusão

1. O tratamento contendo hipoclorito de sódio 1,5 mL.L⁻¹ não se mostrou tóxico para a planta, não prejudicando o enraizamento e o desenvolvimento vegetativo *in vitro* de plântulas de *Oncidium varicosum*.
2. Os tratamentos contendo 0,6 g.L⁻¹ de benomyl e chlorothalonil não afetaram o crescimento em altura das plantas e o comprimento da maior raiz, no entanto, a dose de 0,8 g.L⁻¹ provocou influência negativa.
3. O fungicida azoxystrobin foi fitotóxico em todas as concentrações avaliadas.

Referências

- DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN R. H. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.30-37, 1993.
- FALKINER, F. R. *The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture*. Calgary: Internacional Association of Plant Tissue Culture, p.13-23, 1990.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. Edington, *Eversley*, v.1, p.412-420, 1984.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, p.99-169, 1990.
- KERBAUY, G. B. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Reports*, Berlin, n.3, p.27-29, 1984.
- LEIFERT C.; WAITES W. M. *Contaminants of plant tissue cultures*. Calgary: Internacional Association of Plant Tissue Culture Newsletter, p.2-13, 1990.
- LEIFERT, C.; WAITES W. M.; CAMOTTA H.; NICHOLAS J. R. *Lactobacillus plantarum*: a deleterious contaminant of plant tissue culture. *Journal of Applied Bacteriology*, London, n.67, p.363-370, 1989.
- LONG R. D.; CURTIN T. F.; CASSELLS A. C. An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.225, p.83-92, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, n.15, p.473-497, 1962.
- SHIELDS, R.; ROBINSON, S. J.; ANSLOW, P. A. Use of fungicides in plant tissue culture. *Plant Cell Reports*, Berlin, n.3, p.33-36, 1984.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; GAUNTLETT, B. A. Effect of anti-fungal agents on *in vitro* cultures of *Eucalyptus grandis*. *South Africa Journal of Forestry*, Durban, n.175, p.23-27, 1996.
- WRIGHT N.; ALDERSON, P. G.; DULLFORCE W. M. (Ed.). *Micropropagation in horticulture: practice and commercial problems*. London: Institute of Horticulture, p.200, 1986.