

UTILIZAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO NA ESTERILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Gypsophila paniculata*

RAÍSA LEMOS PEDROTTI¹; NISCHA MAENO SILVA¹, EUGENIA JACIRA
BOLACEL BRAGA²; DAIANE DE PINHO BENEMANN³

¹ Estagiários da empresa BioPlant Tech, incubada na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS- raisapedrotti@hotmail.com; nischamaeno@gmail.com

² Laboratório de cultura de tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS- jacirabraga@hotmail.com

³ Sócia proprietária da empresa BioPlant Tech, incubada na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS-daiane_bio@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A produção de mudas de plantas ornamentais e de outras espécies em laboratórios comerciais apresenta custo elevado, como resultado do elevado custo das instalações e da energia necessária. Ultimamente vem crescendo o interesse em se buscar novas opções para essa finalidade, e uma delas tem sido a substituição da técnica de esterilização por autoclavagem, por alguma outra de menor custo (TEIXEIRA et al. 2008).

A autoclavagem de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos (BURGER, 1988) encarece a produção de mudas em laboratório, em razão do elevado custo do equipamento e do igualmente elevado consumo de energia, além do longo tempo necessário para esterilização de limitado número de frascos. Além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura (BALL, 1953). A opção do uso de forno de micro-ondas com esse objetivo tem sido testada sem muito sucesso (TISSERAT et al. 1992; TEIXEIRA et al. 2005), em consequência da ebulição e transbordamento prematuros do líquido, antes da sua completa esterilização. A esterilização de meios nutritivos por meio químico é outra opção teoricamente possível, porém negligenciada.

TEIXEIRA et al. (2005) levantaram informações que permitiram o estabelecimento de um protocolo de preparo de meios de cultura que utiliza, como esterilizante, o hipoclorito de sódio em concentrações muito abaixo daquelas relatadas por YANAGAWA et al. (1995). Recentemente, TEIXEIRA et al. (2006) mostraram que o uso do referido protocolo, além de permitir a eliminação da contaminação introduzida no meio pelos explantes provenientes de cultura in vitro de abacaxizeiro, resultou também no aumento do número de ramos e do peso da biomassa fresca. O objetivo desta pesquisa foi usar o referido protocolo (TEIXEIRA et al. 2006), para a multiplicação de *Gypsophila paniculata in vitro*, o qual difere do protocolo tradicional, desenvolvido por MURASHIGE; SKOOG (1962), por utilizar solução clorada na sanitização sistemática dos utensílios utilizados na preparação e acondicionamento do meio de cultura, além de adicionar o NaClO diretamente ao meio de cultura.

2. METODOLOGIA

O material vegetal utilizado para extração dos explantes foi proveniente de culturas-estoque de *Gypsophila paniculata in vitro*, da empresa BioPlant Tech, incubada na Conectar (Incubadora de base tecnológica da Universidade Federal de Pelotas). A empresa realiza seus trabalhos no laboratório de cultura de tecidos de Plantas, pertencente ao Departamento de Botânica, UFPEL.

O meio de cultivo empregado foi o MS/2 (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 200 mgL de inositol, 20 gL sacarose, 0,5 mgL⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) 7,5 gL de ágar e o pH ajustado para $\pm 5,8$ antes da autoclavagem a 121 °C à 1,5 atm por 20 min.

Os tratamentos consistiram nas seguintes concentrações de NaClO (p/v) no meio de cultura: sem adição de cloro ativo (meio de cultivo foi autoclavado); sem adição de cloro ativo (meio de cultivo não foi autoclavado); 0,005%; 0,007% e 0,009% de cloro ativo adicionado ao meio de cultivo em frascos de vidro (capacidade de 200ml) e de plástico (capacidade de 500ml). Foi adicionado 30 ml de volume de meio de cultivo aos frascos.

Todos os frascos, tampas e utensílios para realização do meio de cultivo foram lavados com água corrente e detergente e enxaguados com água destilada e posteriormente em solução de hipoclorito 0,003%. Esta última etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar. Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas em ambiente não-estéril e somente o enchimento dos frascos com meio de cultivo foi efetuado na capela de fluxo laminar, para os tratamentos onde o meio não foi autoclavado. Os frascos das culturas foram incubados por 45 dias em sala de cultivo a uma temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e $40 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiância.

Os parâmetros utilizados para avaliação do estudo foram: número de explantes contaminados, porcentagem de explantes contaminados, média do número de brotos por explante, média do comprimento dos brotos (cm), número de explantes com raiz e porcentagem de explantes com raiz. A coleta de dados correspondentes à contaminação do meio de cultura foi feita pelo aspecto visual destes a olho nu, decorridos dos dias da inoculação dos explantes nos meios. Foram consideradas como não contaminadas as culturas que se apresentaram límpidas, sem nenhuma mancha na superfície ou no interior do meio de cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez tratamentos, contendo seis repetições, cada repetição com 5 explantes, totalizando 30 explantes por tratamento. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na tabela 1, os tratamentos cujos meios não foram autoclavados, porém foram esterilizados com 0,005% de NaClO, apresentaram 100% de contaminação, seguido dos meios e frascos não autoclavados sem adição de NaClO, com frascos de vidro (83,33%) e plástico (50%). Esses resultados demonstraram que frascos não autoclavados com meio esterilizado em baixa concentração de NaClO ou na ausência deste, não foram eficientes.

A ausência de contaminação ocorreu quando o meio de cultivo e frasco de vidro foram autoclavados, sem adição de NaClO e nos frascos de plástico, cujos meios foram esterilizados quimicamente com 0,007 e 0,009% de NaClO. A baixa contaminação também foi encontrada nos tratamentos cujos frascos de vidro não foram autoclavados, porém o meio foi esterilizado com 0,007% (16%) e 0,009% (16%) de NaClO (Tabela 1). Isso se constitui em uma vantagem adicional desse novo protocolo de esterilização química em relação ao protocolo tradicional de esterilização por autoclavagem, possibilitando assim a eliminação de micro-organismos endógenos e a realização da operação de enchimento dos frascos de cultura, bem como a inoculação do meio, em ambiente com elevado índice de

assepsia. Resultados semelhantes foram encontrados por TEIXEIRA et al. (2008) ao analisarem a utilização de NaClO na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* l.

Quanto ao comportamento de *Gypsophila paniculata*, observou-se que a presença de NaClO no meio de cultura, nas concentrações 0,007% e 0,009% testadas, causou um leve aumento no número médio de brotações e no comprimento das mesmas nos frascos de vidro e plástico quando comparado com a ausência do reagente esterilizante nos meios (Tabela 1). Isto indica o efeito benéfico de tais concentrações de cloro no meio sobre o crescimento e multiplicação da *Gypsophila*. A possível influência dos íons cloreto por aumentar a fotossíntese (SALISBURY; ROSS, 1969) não deve ser descartada, uma vez que a deficiência dessa função *in vitro* é bem conhecida. No entanto, essa possibilidade ainda precisa elucidada. RIBEIRO, (2006), observou que concentrações entre 0,005 e 0,007% de cloro ativo total no meio de cultura de *Eucalyptus pellita* estimulam a formação de ramos com maiores comprimentos médios, embora em menor número do que em meio autoclavado, observaram também que concentrações entre 0,0003 e 0,0005 % de cloro ativo total no meio de cultura de *Ananas comosus* estimularam a formação de maior número de brotações e maior peso de biomassa fresca.

Tabela 1. Número e porcentagem de explantes contaminados, número médio de brotos/explante, média do comprimento das brotações, número e porcentagem de explantes com raiz, em explantes de *Gypsophila paniculata*, em função da concentração de cloro ativo total (%) adicionado ao meio de cultura.

Cloro ativo total adicionado ao meio de cultura (%)	Nº de explantes contaminados	% de explantes contaminados	Nº médio de brotos/explante	Comprimentos das brotações	Nº de explantes com raiz	% de explantes com raiz
Frascos de vidro						
0 (autoclavado)	0,00 C	0,00	5,41 A	2,38 AB	30,00 A	100,00
0,005	30,00 A	100,00	0,00 C	0,00 C	0,00 C	0,00
0,007	5,00 C	16,66	2,08 BC	2,97 A	25,00 A	83,33
0,009	5,00 C	16,66	2,22 BC	2,88 A	25,00 A	83,33
0 (não autoclavado)	25,00 AB	83,33	0,77 BC	0,66 BC	5,00 BC	16,66
Frascos de plástico						
0 (autoclavado)	10,00 BC	33,33	1,75 BC	1,54 ABC	20,00 AB	66,66
0,005	30,00 A	100,00	0,00 C	0,00 C	0,00 C	0,00
0,007	0,00 C	0,00	2,27 B	2,20 AB	30,00 A	100,00
0,009	0,00 C	0,00	2,08 BC	2,20 AB	30,00 A	100,00
0 (não autoclavado)	15,00 BC	50,00	1,19 BC	1,26 ABC	15,00 ABC	50,00

diferem entre si pelo teste de 5%.

Foi encontrado maior número de raízes em frascos de vidro e meio de cultivo autoclavado (30,00), e com adição de 0,007% e 0,009% de NaClO (25,00), bem como em frascos de plástico nas maiores concentrações de NaClO (30,00), não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 1). Não foram observados danos às raízes, como escurecimento ou sinais de oxidação que poderiam ser causados

pelo dióxido de cloro, nas concentrações utilizadas, e as raízes se mantiveram brancas e pilosas, características da espécie. CARDOSO, 2009 ao estudar a esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio não encontrou diferença estatística entre os meios autoclavados e não autoclavados com a presença do NaClO.

4. CONCLUSÕES

O uso da esterilização química é uma alternativa adequada ao sistema de autoclavagem, e o dióxido de cloro a 0,007% pode ser empregado para o processo de esterilização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lancaster-PA, v.80, p.409-411, 1953.
- Burger, D.W. Guidelines for autoclaving liquid medium used in plant tissue culture. **HortScience**, v.23, p.1066–1068, 1988.
- CARDOSO, J.C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.7, p.785-788, 2009.
- MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows** - versão 2.0. Pelotas, 2002.
- MURASHIGE, T.M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-97, 1962.
- RIBEIRO, J.M. **Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem**. Maio de 2006. Tese (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias), Pós graduação em produção vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C. **Plant physiology**, Wadsworth Publishing co, Belmont, 1969.
- TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v. 86, n.3, p.375-378, 2006.
- TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, A.T. Use of sodium hypochlorite in sterilization of culture medium for multiplication of *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.
- TEIXEIRA, S.L.; SOUSA, R.T.S.; TEIXEIRA, M.T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista CERES**, Viçosa – MG, v. 52, p.343-349, 2005.
- TISSERAT, B.; JONES, D.; GALLETTA, P.D. Microwave sterilization of plant tissue culture media. **HortScience**, Alexandria-VA, v. 27, p.358-361, 1992.
- YANAGAWA, T.; NAGAI, M.; OGINO, T.; MAEGUCHI, R. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. **Lyndleyana**, Palm Beach, Fla, v. 10, p. 33-36, 1995.