

Multiplicação de sequóia (*Sequoia sempervirens* L.) em meio de cultura esterilizado com hipoclorito de sódio.

Ribeiro, Juliana Martins¹ e Teixeira, Silvio Lopes²

¹ Pesquisadora da área de Biotecnologia Vegetal da EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido-Laboratório de Biotecnologia Vegetal-Rodovia BR 428 Km 152, caixa postal 23, CEP: 56.300-970, fone (87) 3862-1711, ramal 167, Petrolina, Pernambuco, e-mail:

juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br; ² Professor Adjunto da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais-, Avenida Alberto Lamego, 2000, CEP: 28013-602, fone (22) 2726- 1664, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, e-mail: teixeira70@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Dentre as alternativas existentes para tornar as instalações das biofábricas mais econômicas, as mais importantes seriam a substituição da de autoclavagem por alguma outra técnica mais econômica, bem como o uso da luz solar na iluminação da sala de crescimento de plantas (Ponce et al., 2000).

A autoclavagem, técnica mais comumente utilizada para a esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (Burger, 1988), é uma operação dispendiosa, devido ao elevado custo do equipamento e do igualmente elevado consumo de energia, podendo levar à decomposição de componentes do meio de cultura, como a sacarose (Street e Lowe, 1950; Ball, 1953). Por estes motivos, a substituição desta técnica de esterilização por alguma outra menos dispendiosa e que não comprometa a integridade do meio nutritivo seria altamente desejável.

O desenvolvimento de protocolos de esterilização de meios de cultura por meios químicos é de grande interesse nesse sentido, entretanto, pouca informação é encontrada na literatura científica. Snow (1985) relatou o emprego de peróxido de hidrogênio para reduzir a contaminação de meios de cultura para germinação de sementes de orquídea, enquanto Yanagawa et al. (1995) afirmam ter obtido sucesso na inoculação de sementes de orquídea em meio de cultura, em condições não assépticas, esterilizando-o com hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogênio.

Atualmente, Teixeira (2005), Teixeira et al. (2006) levantaram informações que lhes permitiram desenvolver um protocolo de preparo de meio de cultura utilizando o hipoclorito de sódio com eficiência total. O objetivo desta pesquisa foi comparar a eficiência deste protocolo com o protocolo convencional, que utiliza a autoclavagem como método de esterilização, bem como analisar o comportamento de plantas de sequóia em meio de cultura esterilizado com hipoclorito de sódio.

METODOLOGIA

Culturas-estoque de *Sequoia sempervirens*, mantidas por passagens de 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 27 ± 2 °C, em meio nutritivo contendo sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas, 100 mg L^{-1} de inositol e 30 g L^{-1} de sacarose, foram utilizadas como doadoras de explantes para esse experimento.

A vidraria utilizada no preparo e acondicionamento do meio de cultura foi proveniente do depósito, onde havia sido armazenada após o uso anterior, depois de lavada com detergente e enxaguada com água clorada com 0,001 % de hipoclorito de sódio (preparada a partir de solução de hipoclorito de sódio a 6,75 %). No momento de preparo do meio, a vidraria foi novamente enxaguada com água clorada adicionada de 0,003% de hipoclorito de sódio, excetuando-se os tratamentos controle A e B, cujos utensílios foram enxaguados apenas com água deionizada, e os tubos nos quais seriam adicionados os meio de cultura para inoculação das plantas, que foram enxaguados no momento da adição do meio de cultura aos tubos.

Após o enxague das vidrarias, procedeu-se o preparo da água utilizada para completar o volume final do meio de cultura, constituindo-se de água deionizada adicionada de 0,0005% de hipoclorito de sódio (p/v). O preparo da mesma foi feito em recipiente previamente enxaguado em água clorada com 0,003% de hipoclorito de sódio (p/v).

Em seis Erlenmeyers, cada um correspondente a um tratamento, foram adicionados todos os reagentes para o preparo dos meios de cultura, conforme Murashige e Skoog (1962). Os tratamentos consistiram das seguintes concentrações de hipoclorito de sódio (p/v): a) meio de cultura sem adição de NaClO e autoclavado (controle A); b) meio de cultura adicionado de 0,002 % de NaClO; c) meio de cultura adicionado de 0,003 % de NaClO; d) meio de cultura adicionado de 0,004 % de NaClO; e) meio de cultura adicionado de 0,005 % de NaClO; e f) meio sem adição de NaClO, mas sem autoclavar (controle B).

Após 15 minutos da adição do NaClO aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$, o volume final de cada tratamento foi completado com a água de preparo de meio (0,0005% de NaClO), e os Erlenmeyers com os meios de cultura foram introduzidos no forno de microondas para fusão do PHYTAGEL.

Após a fusão do PHYTAGEL, realizou-se a enxague em água clorada com 0,003% de hipoclorito de sódio (p/v) dos tubos de ensaio nos quais foram adicionados os meios de cultura de cada tratamento. Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas em ambiente não estéril. O enchimento dos frascos foi efetuado na capela de fluxo laminar 15 minutos após o enxágüe destes em água clorada com 0,003 % de hipoclorito de sódio.

Um mês após a inoculação dos explantes nos meios com os tratamentos foram coletados dados referentes ao número e comprimento médio dos ramos por cultura, e ao número de culturas contaminadas para os meios autoclavados e esterilizados quimicamente.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, sendo a unidade experimental constituída de um explante por tubo e 20 repetições. Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey com 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra uma cultura de cada um dos seis tratamentos, sendo cada tratamento constituído por 20 tubos de ensaio.



Figura 1. Plantas de *S. sempervirens* representativas de cada um dos seis tratamentos A, B, C, D, E e F.

Não foram observadas diferenças morfológicas significativas entre as plantas de todos os tratamentos com NaClO, havendo diferenças apenas quanto ao número e ao comprimento dos ramos.

A tabela 1 mostra dados referentes ao número e a porcentagem de culturas contaminadas e ao tamanho e número médio de ramos por cultura dos tratamentos autoclavados e aqueles contendo 0,002; 0,003; 0,004 e 0,005% de hipoclorito de sódio no meio nutritivo. Os dados referentes ao tamanho e número médio de ramos por cultura do tratamento no qual não foi feita esterilização por nenhum dos dois métodos (autoclavagem ou esterilização química), não foram adicionados a tabela, devido terem todas as culturas sido contaminadas.

Tabela 1. Número e porcentagem de culturas de sequóia contaminadas e número e tamanho médio de brotos em função da concentração de hipoclorito de sódio (p/v) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade

NaClO adicionado ao meio de cultura (p/v)	Tratamento	Culturas contaminadas		Número médio de ramos por cultura	Comprimento médio dos ramos por cultura (cm)
		Número	Porcentagem		
0 (autoclavado)	A	1 b	5	3,63 d	3,27 a
0,002	B	1 b	5	5,53 a	2,46 d
0,003	C	0 b	0	5,28 ab	2,56 cd
0,004	D	0 b	0	5,1 b	2,65 c
0,005	E	0 b	0	4,0 c	2,84 b
Sem esterilização	F	20 a	100	-	-

De acordo com os dados da tabela 1, o tratamento autoclavado A e os tratamentos esterilizados quimicamente B, C, D e E apresentaram número de culturas contaminadas estatisticamente iguais entre si e menores do que o valor apresentado pelo tratamento sem esterilização. A partir do tratamento C, que corresponde a da concentração de 0,003% de hipoclorito de sódio no meio de cultura, não ocorreu qualquer contaminação, indicando serem estas concentrações seguras neste sentido.

O valor médio de número de ramos por cultura foi mais elevado para as concentrações de 0,002 e 0,003% de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Todos os tratamentos esterilizados quimicamente apresentaram valores superiores àquele observado no tratamento controle autoclavado. Também foi observado que os tratamentos contendo 0,002; 0,003; 0,004 e 0,005% de hipoclorito de sódio no meio nutritivo apresentaram comprimentos médios de ramos estatisticamente diferentes do valor observado no tratamento controle autoclavado, porém pouco abaixo dele. Contudo, os comprimentos totais dos ramos, resultantes da multiplicação do número médio de ramos com o comprimento médio dos mesmos por tratamento, nos tratamentos contendo 0,002; 0,003 e 0,004% de hipoclorito de sódio no meio de cultura ultrapassaram 13 cm, enquanto no tratamento autoclavado não chegaram a atingir 12 cm. Levando-se em consideração que, em geral, um maior número de ramos implica em um menor comprimento desses, esta correspondência pode ser vista na tabela 1, onde se observa que ao menor número médio de ramos para o tratamento esterilizado por autoclavagem, corresponde um maior comprimento médio de ramos para esse tratamento, e vice-versa.

Levando-se em conta estas considerações e também que a partir da concentração de 0,003% de hipoclorito de sódio no meio de cultura não ocorreu nenhuma cultura contaminada, as concentrações de 0,003 e 0,004% seriam as mais recomendadas para esterilização química de meio nutritivo para crescimento *in vitro* de *S. sempervirens*.

As concentrações ótimas de hipoclorito de sódio observadas neste trabalho diferem em muito daquelas relatadas por Yanagawa et al. (1995), as quais só foram bem sucedidas, quanto à obtenção de assepsia, quando esterilizaram o meio com 0,01 % de NaClO e o pulverizaram

com 0,5 % do mesmo esterilizante. Neste trabalho, ficou claro que as quantidades usadas pelos autores citados são altamente prejudiciais às culturas e que há possibilidade de se esterilizar meios de cultura com quantidades muito inferiores de cloro, desde que se aplique a metodologia utilizada nesta pesquisa. Antes de desenvolverem esta metodologia, Teixeira (2005) também só conseguiu esterilização completa do meio de cultura com concentrações muito elevadas de cloro.

CONCLUSÕES

É possível obter assepsia de meios de cultura mediante o emprego de concentrações reduzidas de hipoclorito de sódio no meio nutritivo, quando combinadas a outras medidas de assepsia adotadas nesta pesquisa. A adoção do procedimento de esterilização química dispensa o uso de autoclave para esterilização de meios nutritivos e vidrarias. As concentrações entre 0,003 e 0,004% de hipoclorito de sódio no meio de cultura de *Sequoia sempervirens* induzem a formação de ramos em maior número, porém com menor comprimento do que em meio autoclavado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaved media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. **Bul. Torrey Bot. Club.** 80: 409-411, 1953.

BURGER, D. W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, 23: 1066-1068, 1988.

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

PONCE, J. N. P., CASTELLÁ, M. S., PÉREZ, P. O. Possibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. In: Instituto de Biotecnología de las Plantas (ed.) **Biotecnología Vegetal**. Villa Clara: Cuba, nº 1, p. 3-12, 2000.

SNOW, R. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. **Amer. Orch. Society Bull**, 54: 178-181, 1985.

STREET, H. E., LOWE, J. S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. **Annals of Botany** 14: 307-329, 1950.

TEIXEIRA, S.L. Chemical sterilization of culture media. **Hort. Bras.** (Suppl.) 23(2): 668, 2005.

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**, 86(3): 375-378, 2006.

YANAGAWA, T., NAGAI, M., OGINO, T., MAEGUSHI, R. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. **Lyndleyana**, 10(1): 33-36, 1995.

PALAVRAS-CHAVE

Sequoia sempervirens, autoclave, micropropagação, esterilização química, hipoclorito de sódio.

AGRADECIMENTOS

À FAPERJ, FENORTE/TECNORTE e à UENF por financiarem esse trabalho.