

INFLUÊNCIA DA AUTOCLAVAGEM E FILTRAÇÃO DA SACAROSE NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DA VIDEIRA¹

Paulo Henrique Pereira Peixoto²
Moacir Pasqual³

1. INTRODUÇÃO

O crescimento fotoautotrófico *in vitro* tem sido restrito a poucas espécies (4, 6, 7). Isso somente é possível pelo enriquecimento da atmosfera dos recipientes de cultura com CO₂, sendo, nesse caso, dispensável o fornecimento exógeno de fontes de esqueletos de carbono (4, 8). Contudo, esta é uma técnica dispendiosa e trabalhosa, sendo muito pouco utilizada na micropropagação em larga escala (7).

As células, os tecidos e os órgãos cultivados *in vitro* são potencialmente capazes de crescer fotoautotroficamente (7). Todavia, essas culturas não encontram condições adequadas de iluminação, CO₂ e teor de clorofila (6). O crescimento da maioria das culturas *in vitro* é sustentado pela sacarose adicionada ao meio de cultura. Ao mesmo tempo, reconhece-se que a presença desse carboidrato inibe intensamente a biossíntese da clorofila e, conseqüentemente, a capacidade fotossintética das plantas (4, 6, 7, 9).

A esterilização dos meios de cultura é feita, geralmente, por autoclavagem, à temperatura de 121°C, por um período de 15 a 20

¹ Aceito para publicação em 23.02.1995.

² Departamento de Botânica, Universidade Federal de Juiz de Fora. 36036-330 Juiz de Fora, MG.

³ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. Cx. Postal 37 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

minutos. Entretanto, o aquecimento do meio de cultura em temperaturas muito elevadas e por períodos muito longos pode provocar alterações nos seus componentes, recomendando-se, então, que para compostos termolábeis a esterilização seja feita por filtração, a frio (1, 2, 9, 10).

Durante a autoclavagem do meio de cultura, a sacarose é quebrada em seus monossacarídeos componentes, glicose e frutose. A extensão da hidrólise depende do modo de esterilização da sacarose, se juntamente com os demais componentes do meio de cultura ou isoladamente em solução aquosa (1, 7).

Algumas espécies se desenvolvem melhor em meio de cultura autoclavado do que em meio filtrado, sugerindo que as células dessas culturas se beneficiam da glicose e frutose prontamente disponíveis (5). Contudo, a autoclavagem prolongada pode levar à caramelização da sacarose, e os produtos dessa reação podem ser tóxicos, inibindo o crescimento dos tecidos (7, 9).

A filtração das substâncias orgânicas termolábeis pode ser realizada a frio em filtros de nitrocelulose ou acetato de celulose, do tipo Millipore (1, 4). Esses filtros apresentam diâmetro variável, de acordo com cada tipo de material a ser esterilizado. Após a filtração, o material estéril obtido é adicionado asépticamente aos demais componentes do meio de cultura, em câmaras de fluxo laminar (2).

Objetivou-se com este trabalho comparar processos de esterilização da sacarose no meio de cultura e verificar o seu efeito sobre o crescimento e desenvolvimento de segmentos nodais do porta-enxerto da videira RR-101-14.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras, MG.

Para a instalação dos ensaios foram utilizados segmentos nodais do porta-enxerto da videira RR-101-14 obtidos *in vitro*. Os explantes constaram de segmentos de caule medindo 2,5 cm, apresentando duas gemas. Cada explante foi inoculado horizontalmente em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura C₂D (3) adicionado de 0,5 mg.l⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 7,0 g.l⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem. A sacarose foi adicionada ao meio de cultura na concentração de 30 g.l⁻¹, nas seguintes formas: a) autoclavada juntamente com os demais componentes do meio de cultura; b) esterilizada por filtração; c) autoclavada juntamente com os demais componentes do meio, isoladamente do ágar; d) autoclavada em solução aquosa, isoladamente dos demais componentes do meio, totalizando

quatro tratamentos. A filtração da solução de sacarose foi realizada, utilizando-se filtros de acetatocelulose/nitrocelulose do tipo Millipore, com diâmetro de poros de 0,22 μm . Foram utilizadas cinco repetições por tratamento e cada parcela constou de cinco tubos de ensaio contendo um único explante. Para a análise estatística os dados foram transformados para \sqrt{x} e, então, submetidos à análise de variância e ao teste de médias (Tukey, a 5%). Após a inoculação, os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h, termoperíodo de 27/25°C e luminosidade de 35 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. O ensaio foi avaliado 45 dias após a instalação para as seguintes variáveis: número médio de brotações (NMB), número médio de brotações superiores a 1,5 cm (NMB1,5), peso da matéria fresca (PMF) e peso da matéria seca (PMS) das brotações por explante. Após a obtenção do PMF, os tecidos foram transferidos para estufas de secagem até atingirem peso constante e, então, submetidos à pesagem para obtenção do PMS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos significativos foram obtidos para NMB ($P < 0,01$) e para NMB1,5 e PMS ($P < 0,05$). Para PMF não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Quadro 1).

Em relação ao número médio de brotações, as maiores taxas de multiplicação foram obtidas no tratamento em que a sacarose foi adicionada ao meio de cultura por filtração, seguido do tratamento em que a sacarose foi autoclavada, separadamente do ágar. No tratamento em que

QUADRO 1 - Análises de variância referentes ao número médio de brotações, número médio de brotações superiores a 1,5 cm, peso da matéria fresca e seca das brotações por explante do porta-enxerto da videira RR-101-14, em relação às diferentes formas de esterilização da sacarose no meio de cultura

CV	GL	Quadrados médios			
		NMB	NMB1,5	PMF	PMS
Tratamentos	3	0,5152 **	0,6917*	0,0554 ns	0,0009*
Resíduo	16	0,0960	0,2052	0,0221	0,0002
CV (%)		13,2	21,3	8,7	4,3
Média		2,34	1,46	0,325	0,0336

* Significativo a 5 % de probabilidade.

** Significativo a 1 % de probabilidade.

a sacarose foi autoclavada, juntamente com os demais componentes do meio (esterilização normal), o comportamento foi inferior ao observado para os tratamentos anteriores. A menor taxa de multiplicação dos explantes foi observada no tratamento em que a sacarose foi autoclavada isoladamente dos demais componentes do meio de cultura, em solução aquosa (Quadro 2). Esses resultados são comparáveis aos relatados na literatura (7, 9), nos quais respostas variáveis são observadas em relação à forma de esterilização da sacarose no meio de cultura. A melhor resposta do tratamento em que a sacarose foi adicionada ao meio de cultura por filtração sugere a ocorrência de alguma reação química prejudicial durante a autoclavagem, o que pode explicar a redução na taxa de multiplicação dos explantes nos tratamentos em que a esterilização da sacarose foi efetuada por autoclavagem, independentemente da presença ou não dos demais componentes do meio de cultura. Em função dos resultados é possível sugerir que a autoclavagem da sacarose em solução aquosa resulta na produção de uma quantidade de substâncias tóxicas muito maior que na presença dos demais componentes do meio de cultura. Resultados similares foram também observados em relação ao número médio de brotações superiores a 1,5 cm, com melhor desempenho do tratamento em que a sacarose foi esterilizada por filtração. Estes resultados estão de acordo com os relatados por GEORGE e SHERRINGTON (7) e PIERIK (9), que observaram a inibição da multiplicação *in vitro* de explantes em função da autoclavagem da sacarose no meio de cultura. Provavelmente, para os explantes utilizados nos ensaios, as substâncias tóxicas liberadas durante a autoclavagem da sacarose foram muito mais prejudiciais à morfogênese dos explantes que os possíveis efeitos positivos da liberação de glicose e frutose, decorrente dessa forma de esterilização.

Em relação ao peso médio da matéria seca por explante (Quadro 2), maior acúmulo ocorreu no tratamento em que a sacarose foi adicionada ao meio de cultura por filtração. Este resultado era esperado, uma vez que as maiores taxas de multiplicação por explante foram obtidas também nesse tratamento. Para os demais tratamentos, a taxa de produção de matéria seca foi bastante similar, não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos a 5 % de probabilidade.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Estudaram-se os efeitos de diferentes formas de esterilização da sacarose no meio de cultura na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais do porta-enxerto da videira RR-101-14. O meio de cultura utilizado foi o C₂D + 0,5 mg.l⁻¹ de BAP. A sacarose foi esterilizada das seguintes formas: a) autoclavada juntamente com os demais componentes do meio de

cultura; b) adicionada aos demais componentes do meio de cultura por filtração; c) autoclavada juntamente com os demais componentes do meio de cultura e isoladamente do ágar; d) autoclavada isoladamente dos demais componentes do meio, em solução aquosa. Após 45 dias de cultivo *in vitro*, sob fotoperíodo de 16/8 h, termoperíodo de 27/20°C e luminosidade de 35 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o experimento foi avaliado para número médio de brotações, número médio de brotações superiores a 1,5 cm, peso da matéria fresca e seca das brotações por explante. Os resultados mostraram que a filtração da sacarose aumentou a taxa de multiplicação e o acúmulo de matéria seca dos explantes.

QUADRO 2 - Médias referentes ao número médio de brotações, número médio de brotações superiores a 1,5 cm, peso da matéria fresca e seca por explante do porta-enxerto da videira RR-101-14, em relação às diferentes formas de esterilização da sacarose

Tratamento ¹	NMB	NMB1,5	PMF(g)	PMS (g)
A	2,1843 b ²	1,3757 ab	0,2834 a	0,0284 ab
B	2,8067 a	1,9872 a	0,4816 a	0,0534 a
C	2,3028 ab	1,3657 ab	0,2576 a	0,0264 b
D	2,0835 b	1,1121 b	0,2754 a	0,0260 b

¹ Tratamento A = sacarose autoclavada juntamente com os demais componentes do meio de cultura;

Tratamento B = sacarose adicionada ao meio de cultura por filtração;

Tratamento C = sacarose autoclavada juntamente com os demais componentes do meio de cultura, isoladamente do ágar;

Tratamento D = sacarose autoclavada isoladamente dos demais componentes do meio, em solução aquosa.

² As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

5. SUMMARY

(EFFECTS OF SACCHAROSE AUTOCLAVING AND FILTRATION ON GRAPEVINE PROPAGATION *IN VITRO*)

This study was carried out to evaluate the effects on micropropagation of grapevine rootstock 'RR-101-14' of different saccharose sterilization forms in nutrient media. The culture media used was C₂D + 0.5 mg.l⁻¹ BAP. The treatments were: a) saccharose and other

nutrients autoclaved all together; b) saccharose esterilized by filtration; c) saccharose and other nutrients autoclaved all together without agar; d) saccharose autoclaved in pure aqueous solution. The best results after 45 days in culture were obtained when saccharose was sterilized by filtration.

6. LITERATURA CITADA

1. BÜTER, B.; PESCIPELLI, S.M.; BERGER, K.; SCHIMID, J.E. & STAMP, P. Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. *Plant Cell Reports*, 13:79-82, 1993.
2. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S.(ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, EMBRAPA/CNPQ, 1990. p. 37-70.
3. CHÉE, R.; POOL, R.M. & BUCHER, D. *A method for large scale in vitro propagation of Vitis*. New York, New York Food and Life Science, 1984. 9 p. (Bulletin, 109).
4. DENG, R. & DONNELLY, D.J. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. *HortScience*, 28: 1048-1051, 1993.
5. DREW, R.A.; CONSIDINE, J.A. & McCOMB, J.A. Effect of fructose on growth of papaw shoot explant *in vitro*. *Aust. J. Bot.*, 41: 739-48, 1993.
6. FIGUEIRA, A. & JANICK, J. Optimizing carbon dioxide and light levels during *in vitro* culture of *Theobroma cacao*. *J. Amer. Soc. Hort Sci.*, 119:865-871, 1994.
7. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories*. Eversley, Exegetics, 1984. 709 p.
8. LANGFORD, P.J. & WAINWRIGHT, H. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, 60:633-640, 1987.
9. PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*, Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
10. TISSERAT, B.; JONES, D. & GALLETTA, P. D. Microwave sterilization of plant tissue culture media. *HortScience*, 27:358-361, 1992.