

Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio

Juliana Martins Ribeiro ¹, Silvio Lopes Teixeira ², Débora Costa Bastos ³

RESUMO

A autoclavagem, técnica utilizada para esterilização de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório, é uma operação onerosa, devido ao alto custo do equipamento e do também elevado consumo de energia. Por estes motivos, a substituição dessa técnica de esterilização por outra com custo reduzido, como a esterilização química, pode ser uma alternativa desejável. A presente pesquisa teve como objetivo a comparação entre as técnicas de esterilização de meios para produção de calos de fáfia com hipoclorito de sódio e por autoclavagem, de modo a obter um procedimento menos dispendioso e mais rápido. Também foi analisado o efeito da sacarose do processo de formação de calos em explantes de fáfia. Para esse propósito, foram analisadas cinco diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹) e dois métodos de esterilização do meio nutritivo (químico e autoclavagem). Os resultados demonstraram não haver diferenças significativas no desenvolvimento dos calos entre os meios autoclavados e esterilizados quimicamente, sendo o fator responsável pela diferença entre a biomassa fresca dos calos, obtida nos diferentes tratamentos, resultante apenas da variação na concentração de sacarose.

Palavras-chave: Concentração de sacarose, esterilização química, furfural, autoclavagem.

ABSTRACT

Callogenesis in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen explants cultivated in nutritive media sterilized with sodium hypochlorite

The autoclaving used for sterilization of glassware, culture media and surgical materials in laboratory is a costly operation, due to the high cost of the equipment and the equally high consumption of energy. For these reasons, the substitution of this sterilization technique by some other less costly, such as the chemical sterilization, would be highly desirable. The present research was aimed at comparing the techniques of sterilization of fáfia callus formation culture media with sodium hypochlorite with autoclaving, in order to develop a less costly technique in the sterilization of glassware and nutrient media for plant tissue culture. For this purpose, five concentrations of sucrose (0, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹) and two methods of sterilization (chemical and autoclaving) were analyzed. The results showed no difference on callus development between autoclaved and chemically sterilized culture media, being the concentration of sucrose the only responsible for callus fresh biomass differences.

Key words: Sucrose concentration, chemical sterilization, furfural, autoclaving.

Recebido para publicação em abril de 2008 e aprovado em julho de 2009

¹Bióloga, Doutora. Laboratório de Biotecnologia Vegetal, EMBRAPA Semi-Árido, BR 428, Km 152, C.P. 23, Zona Rural, 56300-970, Petrolina, Pernambuco, Brasil, juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br

²Engenheiro Agrônomo, PhD. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Avenida Alberto Lamego 2000, 28013-602, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, teixeira70@yahoo.com.br

³Engenheira Agrônoma, Doutora. Produção Vegetal, EMBRAPA Semi-Árido, BR 428, Km 152, C.P. 23, Zona Rural, 56300-970, Petrolina, Pernambuco, Brasil, debora@cpatsa.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A autoclavagem é o procedimento mais utilizado para a esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (Burger, 1988). Devido ao alto custo do equipamento e também do elevado consumo de energia, o processo é considerado dispendioso, além de promover a formação de furfural, composto químico resultante da decomposição da sacarose (Street & Lowe, 1950; Ball, 1953) em altas temperaturas. Por estes motivos, a substituição dessa técnica de esterilização por uma com menor custo e que não comprometa a integridade do meio nutritivo pode ser uma alternativa desejável.

Produtos patenteados visando ao desenvolvimento de protocolos de esterilização de meios de cultura por meios químicos (Assaf & Kishor, 1995; Diaz *et al.*, 1997) obtiveram baixo nível de aceitação. 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) obtiveram sucesso na inoculação de sementes de orquídea em meio de cultura em condições não assépticas, esterilizando-o com hipoclorito de sódio ou água oxigenada, ambos a 0,01%, e pulverizando o interior do frasco de cultura com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, após a inoculação das sementes.

O hipoclorito de sódio (NaClO) constitui uma das fontes de cloro com possibilidade de utilização como esterilizante químico de meios de cultura. É um produto químico muito empregado para esterilização de superfícies, frutas e hortaliças, água, entre outros. Sua utilização em larga escala é devido ao seu vasto espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além de ser um produto de fácil aquisição e de baixo custo (Estrela *et al.*, 2002).

A viabilidade de utilização e a eficiência do hipoclorito de sódio na eliminação de microrganismos patogênicos, principalmente no ser humano, já foram demonstradas em vários trabalhos publicados. Dentre eles encontram-se a utilização de hipoclorito de sódio para a eliminação de *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Rossoni & Gaylarde, 2000), eliminação de coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.* e bacteriófago anti-*E. coli* (Veschetti *et al.*, 2003), desinfestação de esporos de samambaia (Cox *et al.*, 2003), desinfestação de sementes de amendoim (Araújo *et al.*, 2004), eliminação de patógenos endodônticos (Vianna *et al.*, 2004), desinfestação de abacaxi pérola minimamente processado (Antoniolli *et al.*, 2005), entre outros.

Buscando uma forma alternativa para a esterilização de meios nutritivos em micropropagação, Teixeira *et al.* (2005a; b; c; 2006; 2008) e Ribeiro & Teixeira (2007) adquiriram informações para o desenvolvimento de um protocolo de preparo de meio de cultura utilizando o hipoclorito

de sódio em baixas concentrações com eficiência total. O objetivo do presente trabalho foi analisar o desenvolvimento de calos na presença de diferentes concentrações de sacarose em meios esterilizados quimicamente e autoclavados, utilizando a fáfia como planta teste.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado na extração dos explantes para calogênese de fáfia foi proveniente de cultura-estoque dessa espécie, mantido no banco de germoplasma do Laboratório de Fitotecnia, Setor de Cultura de Tecidos Vegetais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em tubos de ensaio de $25 \times 150 \text{ mm}$, contendo meio de cultura composto pelos sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), 100 mg L^{-1} de i-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel®, 2 mg L^{-1} de ácido indol-3-acético (AIA), 2 mg L^{-1} de ácido indolilbutírico (AIB) e 2 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP), esterilizados por autoclavagem ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, $1,05 \text{ kg cm}^2$, por 15 minutos).

Fragmentos de calos, oriundos de plantas de fáfia doadoras de explantes, foram retirados com auxílio de pinças e bisturis estéreis e transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL do meio anteriormente citado para a obtenção de uma cultura-estoque de calos de fáfia.

Um mês e meio após o preparo das culturas-estoque de calos, procedeu-se ao preparo dos meios nutritivos autoclavados e esterilizados quimicamente que constituíram os tratamentos do experimento. Esses meios foram preparados conforme Murashige & Skoog (1962), vitaminas White (White, 1943), 100 mg L^{-1} de i-inositol, 2 mg L^{-1} de AIA, 2 mg L^{-1} de AIB e 2 mg L^{-1} de BAP, havendo uma variação apenas na concentração de sacarose adicionada ao meio.

Para o preparo dos meios esterilizados quimicamente, toda a vidraria utilizada, os frascos de cultura, as respectivas tampas e a bureta utilizada para o enchimento dos frascos de cultura foram enxaguados com água clorada contendo 0,05% de hipoclorito de sódio (p/v). Também foi adicionado 0,05% de NaClO (p/v) aos meios nutritivos para a realização da esterilização química dos mesmos. Após 15 minutos da adição do NaClO aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ e os frascos de cultura introduzidos no forno de microondas para fusão do Phytigel®. Todo o procedimento de preparo e enchimento dos frascos foi efetuado em ambiente não estéril.

Além da análise do desenvolvimento dos calos nos meios autoclavados e esterilizados quimicamente, foi analisado o efeito das diferentes concentrações de sacarose, sendo elas (g L^{-1}): A) 0, B) 10, C) 20, D) 30 e E) 40. Foram preparados 20 tubos de ensaio contendo 20 mL de meio

MS para cada tratamento, tanto para aqueles que foram autoclavados quanto para os que foram esterilizados quimicamente com a utilização do NaClO.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, com dois métodos de esterilização e cinco concentrações de sacarose, cinco repetições e a unidade experimental contendo quatro tubos, cada um com um explante. Foi realizada a análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Calos de fáfia, provenientes de cultura-estoque, foram retirados dos tubos de ensaio e transferidos para placas de Petri. Eles foram cortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, os quais foram então transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL dos meios de cultura contendo os diferentes tratamentos (métodos de esterilização x concentrações de sacarose). Todo esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com a utilização de utensílios e ferramentas cirúrgicas esterilizados por autoclavagem.

Dois meses após a transferência dos calos para os diferentes tratamentos, eles foram retirados dos tubos nos quais estavam sendo cultivados e coletados dados referentes à sua biomassa fresca para cada tratamento em uma balança de precisão.

Paralelamente, foi realizada a análise qualitativa de furfural para as cinco concentrações de sacarose em ambos os métodos de esterilização. Esse experimento foi realizado para verificação da formação de furfural em altas temperaturas, como resultante da degradação da sacarose. O experimento foi realizado segundo Bobbio & Bobbio (1995), adicionando-se em um Erlenmeyer 2 mL das amostras de meio de cada tratamento, 2 mL de HCL concentrado (~ 37%) e 3 mL de água pura. Em seguida, a solução foi aquecida até o ponto de ebulição, e uma tira de papel de filtro embebido em acetato de anilina (2 mL de anilina + 20 mL de ácido acético 10%) foi colocada sobre a boca do frasco. A presença de furfural foi indicada pelo aparecimento de banda de coloração vermelho-carmin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No tratamento com ausência de sacarose, tanto o autoclavado quanto aquele esterilizado quimicamente, não houve desenvolvimento dos calos. Em relação ao aparecimento de contaminações, não foram observadas culturas contaminadas em nenhum dos tratamentos, tanto esterilizados quimicamente quanto naqueles autoclavados. Esses dados estão de acordo com os observados por Teixeira *et al.* (2006; 2008), que utilizaram o hipoclorito de sódio como esterilizante químico de meios nutritivos em concentrações ainda menores do que a utilizada neste trabalho, e também não observaram a presença de contaminações em nenhum dos tratamentos.

A Tabela 1 mostra os dados obtidos após a análise de variância das médias das biomassas dos calos obtidas nos diferentes tratamentos. Os dados mostraram não ter havido influência do método de esterilização dos meios nutritivos (químico ou autoclavagem) sobre o desenvolvimento dos calos, bem como não ter ocorrido interação entre os fatores “método de esterilização x concentração de sacarose”. Observou-se, entretanto, a influência da concentração de sacarose sobre a calogênese.

De acordo com a Tabela 2, a concentração de sacarose que promoveu o desenvolvimento de calos com maiores pesos de biomassa fresca nos meios esterilizados por autoclavagem foi a de 20 g L⁻¹, ao passo que nos meios esterilizados com 0,05% de NaClO (p/v) os maiores valores de biomassa fresca dos calos foram alcançados adicionando-se 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio nutritivo.

A influência da concentração de sacarose sobre a formação de calos em explantes também foi estudada por outros autores. Sousa *et al.* (2007) realizaram experimentos com explantes de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don e observaram que os níveis de sacarose influenciaram tanto a formação quanto a biomassa fresca dos calos e que a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose adicionada ao meio nutritivo foi a responsável pela formação de calos com biomassas frescas mais elevadas. Cheng *et al.* (1992) relataram que o incremento de sacarose no meio de cultura influenciava na formação de tecido caloso em explantes de *Eucalyptus sideroxylon* A. Cunn. ex Woolls e que as concentrações de 4 e 6% aumentaram a formação dos calos. Erig *et al.* (2004) constataram que a formação de calos na base de explantes de marmeleiro foi mais intensa com 15, 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose, sendo praticamente ausente sem a adição de sacarose no meio de cultura. De Fossard *et al.* (1978) observaram que altas concentrações de sacarose induziram a formação de calo na base dos explantes de *Eucalyptus ficifolia* F. Muell.

Na Figura 1 são apresentados os resultados quanto à análise qualitativa de furfural nos meios de cultura esterilizados quimicamente e autoclavados, tendo sido os mesmos em todas as amostras de meio testadas. Nos meios autoclavados, ocorreu o aparecimento de uma coloração avermelhada no papel filtro (cinza mais escuro na figura 1A) em todas as concentrações de sacarose utilizadas. Ao contrário, quando a amostra era um dos meios esterilizados quimicamente, o papel filtro permaneceu sem coloração (cinza mais claro na figura 1B). Esses resultados comprovam que o processo de autoclavagem promove a decomposição da sacarose e a formação de furfural.

Não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento dos calos entre os meios autoclavados e esterilizados quimicamente, sugerindo que as quantidades de furfural presentes nos meios de cultura autoclavados não estariam afetando de forma negativa o desen-

Tabela 1. Análise de variância das médias das biomassas dos calos de fáfia obtidas nos diferentes métodos de esterilização (M. E.) e concentrações de sacarose (C. S.). UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 2005

Causas de variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
M. E.	1	0,0106501	0,0106501	0,77961 ^{NS}
C. S.	4	14,4472278	3,6118069	0,00001*
M. E. x C. S.	4	0,7367290	0,1841823	0,27580 ^{NS}
Resíduo	40	5,5507071	0,1387677	
Total	49	20,7453140		

* Significativo a 5% de probabilidade.

^{NS} Não significativo.

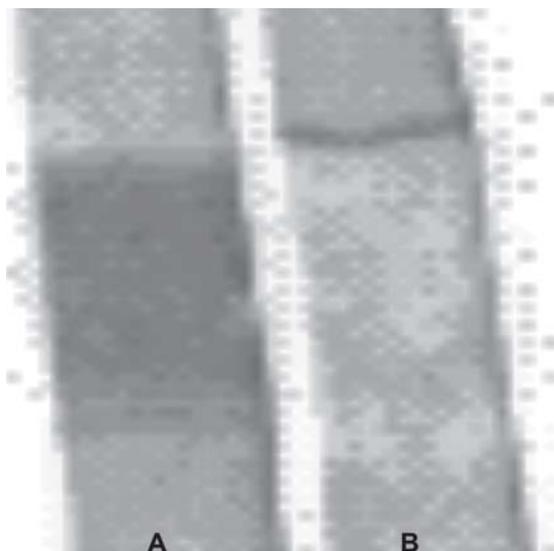
Tabela 2. Biomassa fresca (mg) dos calos de fáfia em função da concentração de sacarose e do método de esterilização dos meios nutritivos

Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	Biomassa fresca (mg)*	
	Autoclavado	Esterilizado quimicamente
0	0,190 e	0,124 d
10	1,231 c	0,990 c
20	1,917 a	1,601 a
30	1,571 b	1,692 a
40	0,954 d	1,284 b

*Os dados acompanhados de uma mesma letra são estatisticamente iguais segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade

volvimento dos calos, assim como a presença do cloro não estaria interferindo negativamente na reação de calejamento. Também não foi observada a interação entre nenhum dos fatores analisados. Sendo assim, o fator responsável pela diferença entre os valores da biomassa fresca dos calos nos diferentes tratamentos seria somente a variação na concentração de sacarose.

Tendo em vista os resultados, pode-se afirmar ser vantajosa a utilização do processo químico para esterilização

**Figura 1.** Análise qualitativa de furfural em meios nutritivos esterilizados por autoclavagem (A) e meios nutritivos esterilizados quimicamente (B).

de meios de cultura na formação de calos em fáfia, uma vez que esse procedimento de esterilização apresentou os mesmos resultados que o processo de autoclavagem, tendo sido efetuado, porém, em tempo reduzido com menores custos.

CONCLUSÕES

A concentração de sacarose adicionada ao meio nutritivo influencia diretamente a formação de calos em explantes de fáfia.

Meios nutritivos responsáveis pela formação de calos em explantes de fáfia podem ser esterilizados quimicamente com NaClO.

O cloro, presente em meios nutritivos esterilizados quimicamente com NaClO, não afeta de forma negativa a formação de calos em explantes de fáfia.

O furfural, resultante da degradação da sacarose, não afeta de forma negativa a formação de calos em explantes de fáfia.

AGRADECIMENTOS

À UENF e à Embrapa Semiárido pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Antoniolli LR, Benedetti BC, Filho MS & Borges MF (2005) Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi “Pérola” minimamente processado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27:157-160.
- Araújo AES, Castro APG & Rossetto CAV (2004) Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. *Revista Brasileira de Sementes*, 26:45-54.
- Assaf ZG & Kishor NP (1995) *Plant Cell Technology, INC. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media*. C12N005/00; C12N005/02. US 5,750,402. United States Patent and Trademark Office – USPTO. Disponível em < <http://www.uspto.gov/patft/index.html> > Acessado em: 23 de abril 2005.
- Ball E (1953) Hydrolysis of sucrose by autoclaving media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 80:409-411.
- Bobbio FO & Bobbio PA (1995) *Manual de laboratório e química de alimentos*. São Paulo, Livraria Varela. 129p.

- Burger DW (1988) Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. *HortScience*, 23:1066-1068.
- Cheng B, Peterson CM & Mitchell RJ (1992) The role of sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. *Plant Science*, 87:207-214.
- Cox J, Bhatia P & Ashwath N (2003) *In vitro* spore germination of the *Schizaea dichotoma* fern. *Scientia Horticulture*, 97:369-378.
- De Fossard RA, Bennet MT, Gorst JR & Bourne RA (1978) Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, 28:427-435.
- Diaz MG, Gonzalez BMM, Salazar YE, Castanedo CNR, Cueto SMC, Gonzalez LCM, Machado RRM, Martin TEL, Ramirez DA (1997) Microcide composition. Bioactivos Químicos CBQ Centro. AO1N43/00. CU EP0920804. European Patent. Disponível em < <http://v3.espacenet.com/texto?AB> > Acessado em: 23 de abril 2005.
- Erig AC, Schuch MW & Chaves AC (2004) Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. mc e adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. *Scientia Agricola*, 5:61-68.
- Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA & Pércora JD (2002) Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13:113-117.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Ribeiro JM & Teixeira SL (2007) Multiplicação de *Sequoia sempervirens* em meio de cultura esterilizado com hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 13:356-360.
- Rossoni EMN & Gaylarde CC (2000) Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61:81-85.
- Sousa CM, Silva RL & Miranda RM (2007) Respostas morfológicas em vinca *in vitro* em função de balanços de fitorreguladores e níveis de sacarose. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9:9-14.
- Snow R (1985) Improvements in methods for the germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, 54:178-181.
- Street HE & Lowe JS (1950) The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Annals of Botany*, 14:307-329.
- Teixeira SL, Teixeira MT & Ribeiro JM (2005a) Chemical sterilization of culture medium 1: culture flasks and covers - rinsing with chlorinated water. *Horticultura Brasileira*, 23:591.
- Teixeira SL, Teixeira MT & Ribeiro JM (2005b) Chemical sterilization of culture medium 2: addition of sodium hypochlorite to the medium. *Horticultura Brasileira*, 23:592.
- Teixeira SL, Ribeiro JM & Teixeira MT (2005c) Chemical sterilization of culture medium 3: flasks filling and medium inoculation under non-sterile environment. *Horticultura Brasileira*, 23:592.
- Teixeira SL, Ribeiro JM & Teixeira MT (2006) Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86:375-378.
- Teixeira SL, Ribeiro JM & Teixeira MT (2008) Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita*. *Revista Ciência Florestal*, 8:185-191.
- Veschetti E, Cutilli D, Bonadorna L, Briancesco R, Martini C, Cencchini G, Anastasi P & Ottaviani M (2003) Pilot-plant comparative study of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. *Water Research*, 33:78-94.
- Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR & Souza-Filho J (2004) *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 97:79-84.
- Yanagawa T, Nagai M, Ogin T & Maeguchi R (1995) Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. *Lyndleyana*, 10:33-36.
- White PR (1943) Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. *Growth*, 7:53-65.