

Esterilização Química de Meios Nutritivos para Cultivo *in vitro* de Plantas

Fotos: Juliana Martins Ribeiro



Juliana Martins Ribeiro¹
Silvio Lopes Teixeira²

A produção de mudas em laboratórios comerciais apresenta valor elevado, provocado, principalmente, pelos altos custos das instalações e da energia elétrica necessária para a manutenção das atividades. Assim sendo, buscam-se novas alternativas para diminuir custos, sendo uma delas a substituição da técnica de esterilização pela autoclavagem por outras de menor custo.

A autoclavagem, técnica comumente utilizada para a esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (Burger, 1988), é uma operação dispendiosa, além de provocar a degradação de alguns componentes do meio, como a sacarose (Street & Lowe, 1950; Ball, 1953), reguladores de crescimento e substâncias orgânicas termolábeis, e alterar o pH. Uma nova abordagem utilizada na micropropagação é a adição de hipoclorito de sódio (NaClO) como esterilizante químico do meio nutritivo, que visa reduzir o tempo para a esterilização de meios nutritivos. Para evitar a degradação de determinados componentes do meio de cultura em altas temperaturas durante o processo de autoclavagem e baixar os custos de manutenção e consumo pelo uso

da autoclave, Teixeira e colaboradores (Teixeira et al., 2005 a, b, c; Teixeira et al., 2006; Teixeira et al., 2008) e Ribeiro & Teixeira (2007; 2008) desenvolveram um protocolo de esterilização de meios de cultura utilizando o hipoclorito de sódio que será descrito a seguir

Procedimentos para a esterilização

- 1) Após o uso da vidraria utilizada no preparo do meio de cultura, bem como frascos de cultura e tampas, todos os materiais devem ser lavados em água de torneira com detergente, enxaguados com água deionizada, adicionada de 0,003% de NaClO (p/v) e guardados em prateleiras limpas em local igualmente limpo;
- 2) No momento do preparo do meio de cultura, toda a vidraria e utensílios que serão utilizados deverão ser novamente enxaguados em água deionizada adicionada de 0,003% de NaClO (p/v);
- 3) Os reagentes, inclusive a fonte de carbono e o agente gelificante, devem ser colocados em um Erlenmeyer, seguindo-se a adição de NaClO a 0,003%, como fator esterilizante do meio;

¹ Bióloga, Pesquisadora Biotecnologia Vegetal, Embrapa Semi-Árido, BR 428, km 152, Zona Rural, CEP: 56302-970, Petrolina-PE, e-mail: juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br;

² Engenheiro Agrônomo, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Avenida Alberto Lamego, 2000, CEP: 28013-602, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: teixeira70@yahoo.com.br

- 4) Após 15 minutos da adição do NaClO com os reagentes, completar o volume final do meio com água deionizada adicionada de 0,0005% de NaClO (p/v), corrigir o pH para 6,0 + 0,1 e levar o Erlenmeyer ao forno de microondas para fundir o agente gelificante;
- 5) Enxaguar os frascos de cultura e tampas em água deionizada adicionada de 0,003% de NaClO (p/v), depositando-os em bancada limpa, previamente higienizada com água clorada;
- 6) Após a fusão do meio de cultura, dispensá-lo nos frascos, no interior da capela de fluxo laminar, e tampar;
- 7) Após a gelificação do meio (no caso de meio semi-sólido), inocular os explantes, utilizando-se capela de fluxo laminar.

Observações importantes para execução do protocolo de esterilização química

- 1) Meio líquido não passa pelo forno de microondas, podendo-se inocular os explantes a serem inoculados logo após o enchimento dos frascos com o meio de cultura;
- 2) A água clorada para diluição do meio de cultura (água deionizada adicionada de 0,0005 % de NaClO) deve ser preparada imediatamente antes de se iniciar qualquer procedimento de preparo do meio nutritivo.
- 3) Esterilização de meio semi-sólido: adicionar 0,003% de cloro ativo total diretamente ao meio de cultura;
- 4) Esterilização de meio líquido: adicionar 0,0003 % de cloro ativo total diretamente ao meio de cultura;
- 5) Água clorada com 0,0005% de hipoclorito de sódio corresponde a 250 μ L de água sanitária (2%) em 1 L de água deionizada;
- 6) Água clorada com 0,003% de hipoclorito de sódio corresponde a 1,5 mL de água sanitária (2%) em 1 L de água deionizada;
- 7) Água clorada com 0,0003% de hipoclorito de sódio corresponde a 150 μ L de água sanitária (2%) em 1 L de água deionizada.

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, v. 80, p. 409-411, 1953.
- BURGER, D. W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 1066-1068, 1988.
- RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. Multiplicação de *Sequoia sempervirens* em meio de cultura esterilizado com hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Brasília, DF, v. 13, p. 356, 2007.
- RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1209-1213, 2008.
- STREET, H. E.; LOWE, J. S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. **Annals of Botany**, Londres, v. 14, p. 307-329, 1950.
- TEIXEIRA, S. L.; TEIXEIRA, M. T.; RIBEIRO, J. M. Chemical sterilization of culture medium. 1. Culture flasks and covers - rinsing with chlorinated water. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2. p.591, 2005a.
- TEIXEIRA, S. L.; TEIXEIRA, M. T.; RIBEIRO, J. M. Chemical sterilization of culture medium. 2. Addition of sodium hypochlorite to the medium. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 2. p. 591, 2005b.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Chemical sterilization of culture medium. 3. Flasks filling and medium inoculation under non-sterile environment. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 2. p. 592, 2005c.
- 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, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 2, p. 185-191, 2008.

Comunicado Técnico, 136

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Esta publicação está disponibilizada no endereço:

<http://www.cpatas.embrapa.br>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semi-Árido

Endereço: C.P. 23, 56302-970, Petrolina-PE

Fone: (87) 3862-1711

Fax: (87) 3862-1744

sac@cpatas.embrapa.br

1ª edição (2008): Formato digital

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Comitê de publicações

Presidente: *Maria Auxiliadora Coêlho de Lima.*

Secretário-Executivo: *Eduardo Assis Menezes.*

Membros: *Geraldo Milanez de Resende,
Josir Laine Aparecida Veschi,
Diógenes da Cruz Batista,
Tony Jarbas Ferreira Cunha,
Gislene Feitosa Brito Gama e
Elder Manoel de Moura Rocha.*

Expediente

Supervisor editorial: *Eduardo Assis Menezes.*

Revisão de texto: *Eduardo Assis Menezes.*

Tratamento das ilustrações: *Háviner Uchoa Pedrosa.*

Editoração eletrônica: *Háviner Uchoa Pedrosa.*