ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA PARA O CULTIVO IN VITRO DE PORTA-ENXERTO DE PESSEGUEIRO

Daiane Peixoto Vargas, Rafaela Silva Formoso, Leonardo Ferreira Dutra, Newton Alex Mayer, Juliano dos Santos, Bernardo Ueno

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul. E-mail: dvbio@hotmail.com

RESUMO

A esterilização dos meios de cultura é normalmente realizada por autoclavagem. Decorre que, este processo pode degradar ou reduzir a ação de compostos com efeito fisiológico desejável, como vitaminas e fitorreguladores. Objetivou-se avaliar a ação de agentes esterilizantes adicionados ao meio de cultura para o estabelecimento in vitro de umezeiro 'Rigitano'. Para tanto, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura MS, preparado considerando os seguintes tratamentos: adição de hipoclorito de sódio (0,01 e 0,05% v/v); de dióxido de cloro (0,1; 0,5 e 1,0 % v/v); e de peróxido de hidrogênio (0,3; 0,7 e 1,5% v/v). O tratamento controle constou da ausência de agente esterilizante, autoclavado e não autoclavado. Em períodos variáveis de avaliação (7, 14 e 21 dias), foram determinadas sobrevivência dos explantes, contaminação total, contaminação por bactéria, contaminação por fungos e oxidação. Constatou-se a ocorrência de fungos dos gêneros *Alternaria, Cladosporium, Penicillium, Trichoderma e Criptococcus.* Pode-se concluir que o uso de peróxido de hidrogênio ou dióxido de cloro é eficiente para a esterilização química de meios de cultivo.

Palavras-chave: dióxido de cloro; hipoclorito de sódio; peróxido de hidrogênio; *Prunus mume.*

CHEMICAL STERILIZATION OF IN VITRO CULTURE FOR PEACH ROOTSTOOK

ABSTRACT

The culture media sterilization is typically performed by autoclaving. However, this process may degrade or reduce the action of compounds with desired physiological effect, such as vitamins and growth regulators. This study aimed to evaluate the effect of sterilizing agents added to the culture medium in vitro mume 'Rigitano' establishment. For this purpose, nodal segments were inoculated into culture medium prepared considering the following treatments: addition of sodium hypochlorite (0.01 and 0.05 % v/v), chlorine dioxide (0.1, 0.5 and 1% v/v) or hydrogen peroxide (0.3, 0.7 and 1.5 %, v/v). The control treatment consisted of the absence of sterilizing, autoclaved and non-autoclaved. In different periods (7, 14 and 21 days), it was determined survival explants, whole contamination, contamination by bacteria, fungi contamination and oxidation. It was found ocurrence of *Alternaria*, *Cladosporim*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Cryptococcus* fungal genera. It was conclude that the use of hydrogen peroxide or chlorine dioxide is effective for the chemical sterilization of culture media.

Keywords: chlorine dioxide; hydrogen peroxide; micropropagation; *Prunus mume;* sodium hypochlorite.

INTRODUÇÃO

O damasqueiro-japonês ou umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) é indicado como porta-enxerto para cultivares de pessegueiro (*Prunus* sp.) em função de características como resistência a pragas e doenças, adaptação e, principalmente, redução no porte de pessegueiros e nectarineiras (MAYER et al., 2001).

As principais formas de produção de mudas da espécie são via semente ou por enxertia e estaquia. No entanto, a propagação via sementes não garante a manutenção das características genéticas da planta de origem, além da lenta taxa de germinação. Neste sentido, trabalhos tem sido conduzidos com propagação vegetativa de umezeiro (NACHTIGAL et al., 1999; MAYER et al., 2001; 2007; CHAGAS et al., 2012). Ressalta-se, porém, que as técnicas de propagação normalmente empregadas não propiciam a qualidade fitossanitária em

comparação aos controles assépticos utilizados para a produção de mudas via micropropagação.

A cultura de tecidos de plantas, alternativa aos métodos de propagação vegetativa, permite entre outras vantagens, o desenvolvimento de clones de elevada qualidade fitossanitária e a rápida multiplicação em curto período de tempo (ROGALSKI et al., 2003). No entanto, os trabalhos com micropropagação de umezeiro, destacando-se os realizados por Harada e Murai (1996) e Ning et al. (2007), relatam a ocorrência de altas taxas de contaminação e oxidação, o que indica a necessidade de otimização de protocolos.

A etapa inicial para introdução de uma espécie *in vitro* é o preparo do meio de cultura e sua esterilização, comumente por autoclavagem, e assepsia dos explantes que darão início ao cultivo. A esterilização física por autoclavagem utiliza altas temperaturas (121ºC) e pressão (1 kgf cm^{-2}) por períodos que variam de 15 a 30 min. (TORRES et al., 1998). No entanto, este processo pode levar a efeitos indesejáveis como redução dos efeitos de fitorreguladores, alteração da composição final de vitaminas, aumento do tempo no preparo de meio de cultura, e consequente aumento do custo final de produção de mudas micropropagadas (BALL, 1953; TEIXEIRA et al., 2008).

Diversas técnicas alternativas à autoclavagem têm sido estudadas em diferentes trabalhos, com procedimentos físicos, como as microondas, e químicos, com uso do hipoclorito de sódio (NaClO) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TEIXEIRA et al., 2005a, 2005b; TEIXEIRA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2008; YANAGAWA et al., 1995). Contudo, tem-se verificado certo grau de fitotoxicidade destes produtos, o que limita o ajuste final de protocolos espécie-específicos.

Os compostos clorados possuem amplo espectro de atividade biocida. Entre os mais utilizados estão o hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio, sendo este menos tóxico para os tecidos vegetais (GRIFFINTGS; RAY, 1979). Além destes, há o dióxido de cloro, um potente desinfetante e agente oxidante, cujas vantagens são a ausência de reatividade com amônia, o que evita a formação de cloraminas, e a estabilidade em soluções na faixa de pH entre 3 e 9, tendo maior efetividade em pH próximo à neutralidade (JUNLI et al., 1997). Este agente esterilizante foi testado em *Anthurium andraeanum* (CARDOSO, 2009) e *Gerbera jamesonii* (CARDOSO; SILVA, 2012).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar agentes esterilizantes no meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de umezeiro Rigitano.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de umezeiro 'Rigitano' oriundas da coleção de porta-enxertos de *Prunus* da Embrapa Clima Temperado, coordenadas geográficas Lat: 31°40'43.20" S, Long: 52°27'03.19" W, foram utilizadas como fonte de explantes. Ramos herbáceos foram coletados das plantas-matrizes e levados para o laboratório de cultura de tecidos, onde o trabalho foi conduzido.

Tubos de ensaio (2 cm x 12 cm) foram esterilizados por autoclavagem, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (0,1% v/v), dióxido de cloro (20% v/v) e peróxido de hidrogênio (30% v/v) e secos em estufa a 120 °C por 24 h.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose; 0,1 g L^{-1} de mio-inositol, geleificado com ágar a 7,5 g L^{-1} e pH ajustado em 5,8. Para sua esterilização, foram testados hipoclorito de sódio (0,01 e 0,05% v/v); peróxido de hidrogênio (0,3; 0,7 e 1,5% v/v) ou dióxido de cloro (0,1; 0,5 e 1,0 % v/v). O tratamento controle constou da ausência de agente esterilizante e autoclavagem. Posteriormente, 10 mL de meio de cultura foram distribuídos nos tubos de ensaio, os quais foram envoltos por parafilme e armazenados a 25±1ºC com fotoperíodo de 16 horas por 15 dias.

Decorrido este período, segmentos nodais, com cerca de 1 cm de comprimento foram isolados, desinfestados com álcool etílico 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 15 min sob agitação e lavados três vezes com água deionizada estéril em câmara de fluxo laminar Veco (mod.: HLFS12, série: FL1032). Após desinsfestação, os explantes foram inoculados no meio de cultura e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições citadas acima.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições de três tubos de ensaio contendo um explante cada um. Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, foi avaliada a sobrevivência dos explantes, contaminação total, contaminação por bactéria, contaminação por fungos e oxidação.

Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando o software R (R Development Core Team, 2009), sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (SILVA, 2010).

A contaminação fúngica foi identificada de acordo com Barnett e Hunter (1998), enquanto a contaminação bacteriana foi contabilizada, mas as bactérias não foram classificadas em nível taxonômico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve ocorrência de contaminações durante o período de 30 dias, antes da inoculação do explante, com exceção do controle positivo (meio de cultura não autoclavado) (Figura 1 a, b), o que indica que a fonte principal de contaminação seja, possivelmente, o explante. Neste sentido, as colônias, tanto de fungos, quanto de bactérias, podem ter sobrevivido endofiticamente e migrado para o meio de cultura quando as condições tornaram-se favoráveis.

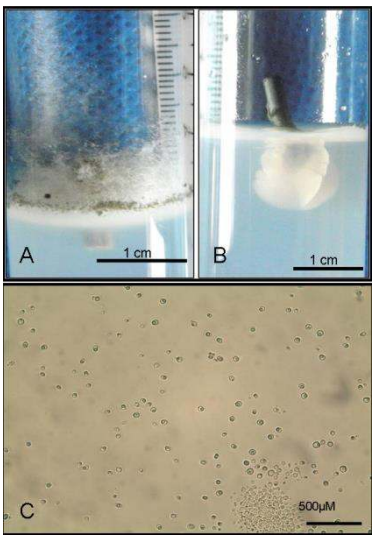


Figura 1. Contaminação de segmento nodal de umezeiro 'Rigitano' por (A) *Cladosporium* sp. e por colônia bacteriana (B), em meio de cultura após 30 dias de inoculação; (C) conídios de *Criptococcus* spp. visualizados em microscópio óptico.

Houve diferença significativa quanto à sobrevivência dos explantes nos períodos de avaliação, sendo observada redução da taxa de sobrevivência (57%) aos 21 dias após a inoculação. Aos 7 dias foi observado 22% de contaminação, porém, o aumento gradativo observado nas duas avaliações sucessivas não foi significativo (Tabela 1). Esta tendência pode ter sido em função do período de latência dos microrganismos e do tempo necessário para a sua multiplicação no meio de cultura. Outra causa seria a degradação gradual dos agentes bactericidas e fungicidas, tornando baixa ou nula sua eficiência.

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência e contaminação de segmentos nodais de umezeiro 'Rigitano' aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

Tempo	Sobrevivência (%)	Contaminação (%) [ns]
7 dias	78,0 a	22,0
14 dias	68,0 ab	27,6
21 dias	57,0 b	31,9

* ns: não significativo.

Nos meios contendo peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro e no controle (meio autoclavado), foram observadas as menores taxas de contaminação e, consequentemente, as maiores médias de sobrevivência (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência e contaminação de segmentos nodais de umezeiro 'Rigitano', cultivados em meio de cultura MS submetido a diferentes métodos de esterilização química, após 21 dias de inoculação *in vitro*.

Agente esterilizante	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)
Peróxido de Hidrogênio	80,4 a	14,7 c
Dióxido de cloro	78,0 a	15,9 c
Hipoclorito de sódio	45,0 b	45,8 b
Controle – (autoclavado)	89,0 a	11,0 c
Controle + (não autoclavado)	22,5 c	77,4 a

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan (P≤0,005).

A contaminação foi significativamente maior no meio de cultura não autoclavado (77,4%) diferindo dos demais tratamentos (Tabela 2). Os principais gêneros de fungos contaminantes encontrados foram *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp e *Cryptococcus* sp. (Figura 1C).

As concentrações de peróxido de hidrogênio não diferiram significativamente em relação às taxas de sobrevivência e oxidação. No entanto, as menores taxas de contaminação foram observadas quando utilizou-se 1,5% e 0,7% (Tabela 3). Estes resultados são menores quando comparados aos obtidos para *Lilium longiflorum* por Curvetto et al. (2006) que constataram até 40% de contaminação no estabelecimento *in vitro* em relação ao uso de hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v).

Quando utilizou-se dióxido de cloro a 0,5 e 1 %, foi obtido o menor índice de contaminação (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados por Cardoso (2009), que no cultivo *in vitro* de *Anthurium andraeanum*,em meio esterilizado com dióxido de cloro nas concentrações de 0,005 e 0,01%, mantiveram as culturas estéreis por até 90 dias.

Tabela 3. Porcentagens de sobrevivência, contaminação e oxidação em cultivo de segmentos nodais de umezeiro 'Rigitano', após 21 dias de inoculação em meio MS acrescido de diferentes concentrações de agentes esterilizantes.

Agente esterilizante	Concentração (%)	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)	Oxidação (%)
Peróxido de hidrogênio	0,3	74,3 ns	25,7 a	0,0 ns
	0,7	78,0 ns	14,7 ab	7,3 ns
	1,5	89,0 ns	3,7 b	7,3 ns
Dióxido de cloro	0,1	52,3 b	47,7 a	0,0 b
	0,5	96,3 a	0,0 b	3,7 ab
	1,0	85,3 a	0,0 b	14,7 a
Hipoclorito de sódio	0,01	48,7 ns	40,3 ns	11,0 ns
	0,05	41,0 ns	51,3 ns	7,3 ns

* Médias seguidas por letras distintas nas colunas dentro de cada agente esterilizante diferem entre si pelo teste de Duncan (P≤0,005).
ns não significativo.

Segundo Srebernich (2007), o dióxido de cloro tem ação por mecanismo de transferência de elétrons, agindo na semi-permeabilidade da membrana celular, oxidando os componentes intracelulares de microrganismos Gram negativos e positivos. Este efeito difere daquele do hipoclorito de sódio, que induz, normalmente, maior oxidação. Para o autor, a natureza apolar do dióxido de cloro auxilia na ação sanitizante e esporicida em razão da maior solubilidade em moléculas orgânicas complexas presentes na maioria dos vírus e bactérias.

Para o sucesso da esterilização química é necessária a limpeza prévia das vidrarias com o uso de NaOCl, procedimento adotado neste e em outros trabalhos (TEIXEIRA et al., 2008;

YANAGAWA et al., 1995). O NaOCl gera reações oxidativas com inativação enzimática irreversível em bactérias e fungos e a degradação de lipídios e ácidos graxos (ESTRELA et al., 2002), causando alterações biossintéticas no metabolismo celular e a destruição de fosfolipídios, formando cloraminas que interferem no metabolismo celular.

Considerando que a eficiência da esterilização química com peróxido de hidrogênio e dióxido de cloro não difere daquela da autoclavagem na micropropagação de umezeiro, pode-se sugerir esta alternativa de esterilização nos casos em que seja necessária a adição de produtos como vitaminas e fitorreguladores que sofram comprovadas alterações, tanto com subprodutos tóxicos, como na redução da concentração ideal para resposta fisiológica desejada (SILVA et al., 2009). Além disso, a utilização do dióxido de cloro pode promover eficiente esterilização para diferentes espécies conforme proposto por Cardoso (2009) e Srebernich et al. (2007), os quais relataram um baixo índice de toxicidade.

CONCLUSÕES

A adição de peróxido de hidrogênio ou dióxido de cloro é efetiva na esterilização do meio de cultura para segmentos nodais de umezeiro 'Rigitano'.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, ao CNPq e a Embrapa Clima Temperado pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

REFERENCIAS

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***,* v.80, n.1 p.409-411, 1953. https://doi.org/10.2307/2482086

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. St. Paul, MN.: Am. Phytopatol. Soc. Press, 1998. 218 p.

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. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000700020

CARDOSO, J.C.; SILVA, J.A.T. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. In Vitro Cellular e Developmental Biology, v.48, n.1, p.362–368, 2012. https://doi.org/10.1007/s11627-011-9418-8

CHAGAS, E.A.; CHAGAS, P.C.; PIO, R.; BETTIOL NETO, J.E. Concentrações de ácido indolbutírico na propagação do umezeiro por alporquia. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, v.3, p.1015-1020, 2012.

CURVETTO, N.; MARINANGI, P.; MOCKEL, G. Hydrogen peroxide in micropropagation of *Lilium*. A comparison with a traditional methodology. **Biocell**, Mendoza*,* v.30, n.3, p.497-500, 2006.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ. J. C. E.; MARCHESAN, M. A.; PÉRCORA, J. D. Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. **Bazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.13, n.2, p.113-117, 2002. https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007

GRIFFINGS, L.R.; RAY, P.M. Dependence of cell wall secretion on calcium. **Plant Physiology**, Rockville, v.63, n.5, p.51, 1979.

JUNLI, H.; LI, W.; NANQUI, R.; FANG, M. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. **Water Research**, Delft, v.31, p.3, p.607-613, 1997.

HARADA, H.; MURAI Y. Micropropagation of Prunus mume. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, n.3, p.265–267, 1996. https://doi.org/10.1007/BF02307104

MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C**.** Propagação do Umezeiro (*Prunus Mume* Sieb & Zucc.) por Estaquia Herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura***,* Jaboticabal, v.23, n.3, p.673-676, 2001.

MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; BARBOSA, J.C.; KOBA, V.Y. Distribuição do sistema radicular de porta-enxertos de umezeiro enxertados com o pessegueiro 'Aurora-1'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.7, p.965-973, 2007. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000700008

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum***,* v.15, n.1, p.473-497, 1962. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

NACHTIGAL, J.C.; PEREIRA, F.M.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; MARTINS, F.P. Propagação vegetativa do umezeiro (*Prunus mume*) por meio de estacas herbáceas**.** **Revista Brasileira de Fruticultura***,* Jaboticabal, v.21, n.2, p. 226-228, 1999.

NING, G.G.; FAN, X.L.; HUANG, W.J.; BAO, M.Z.; ZHANG, J.B. Micropropagation of six *prunus mume* cultivars through axillary shoot

proliferation, and ISSR analysis of cloned plants. **Acta Biologica Cracoviensia***,* v.49, n.1, p.25–31, 2007.

R. Development Coreteam. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for stastistical computing**, Vienna, Austria: 2009.

ROGALSKI, M.; GUERRA , M.P.; SILVA, A.L. Multiplicação in vitro da ameixeira "Santa Rosa": efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.365-367, 2003.

SILVA, L. J. Laercio: Duncan test, Tukey test and Scott-Knott test. **R package** version 1.0-1. 2010.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro‑verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.787‑792, 2007. https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400012

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* L. **Ciência Florestal**, v.18, v.2, p.185‑191, 2008.

TEIXEIRA, S.L.; SOUZA, R.T.S.; TEIXEIRA, M.T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, v.52, p.499‑507, 2005a.

TEIXEIRA, S.L.; TEIXEIRA, M.T.; CAMPANATI, M.; ALMEIDA, R.F. Cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de microondas. **Revista Ceres**, v.52, n.2, p.343‑349, 2005b.

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**, v.86, n.1, p.375‑378, 2006. https://doi.org/10.1007/s11240-006-9121-3

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa‑SPI: Embrapa‑CNPH, 1998. v.1, n. 509.

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***,* v.10, n.2, p.33‑36, 1995.

SILVA, F.V.C.; CASTRO, A.M.; CHAGAS, E.A.; PESSONI, L.A. Propagação vegetativa de camu-camu por estaquia: efeito de fitorreguladores e substratos. **Revista Agroambiente Online**, Boa Vista, v.3, n.2, p.92-98, 2009.

Recebido para publicação em 05/10/2015
Revisado em 16/06/2016
Aceito em 17/11/2016